

Das eif5a-Epitop jenseits biologischer Restriktionen

Synthese & funktionelle Analytik

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps Universität Marburg

vorgelegt von

M.Sc. Jan Reutzel

aus Schotten

Marburg/Lahn 2017

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am: 18.12.2017

Erstgutachter: Prof. Dr. Armin Geyer

Zweitgutachter: Jun.-Prof. Dr. Olalla Vázquez

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2018

Hochschulkennziffer: 1180

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2014 bis Januar 2017 am Fachbereich Chemie der Philipps Universität Marburg. Die Durchflusszytometrie Experimente an Jurkat E6 und Jurkat 2D10 HIV-Zellen wurden eigenständig in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jonathan Karn an der Case Western Reserve University (Cleveland, Ohio, USA) im Zeitraum von September bis Dezember 2016 durchgeführt. Aufnahmen der konfokalen Mikroskopie erfolgten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. David MacDonald (ehemals Case Western Reserve University, jetzt. National Institute of Health, Bethesda). Durchflusszytometrie Experimente an den mononukleären Zellen des peripheren Blutes wurden von Dr. Hartmut M. Hanauske-Abel und Dr. Sukwinder Singh an der Rutgers University (Newark, New Jersey, USA) durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt

Prof. Dr. Armin Geyer

Für die große wissenschaftliche Freiheit und der Ermöglichung des USA-Aufenthalts.

Kurzzusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Peptide des eif5a-Proteins synthetisch dargestellt, sodass diese in Lösung eine β -*hairpin* Struktur aufweisen. Die so erhaltenen Peptide wurden auf ihre biologische Wirksamkeit mittels konfokaler Mikroskopie und Durchflusszytometrie untersucht. Die strukturelle Charakterisierung der Peptide erfolgte mittels moderner 2D-NMR-Methoden. Weiterhin wurde untersucht, inwiefern die Größe der Peptide einen Einfluss auf deren Strukturen hat. Hierbei konnten die Peptide soweit vergrößert und strukturell fixiert werden, dass selbst mit bis zu fünf Cystein-Einheiten im Peptid noch eine regioselektive, intramolekulare Disulfid-Oxidation erfolgte. Modulare Mutationen mittels Einbau neuer funktionaler Aminosäuren ermöglichte die Darstellung supramolekularer Aggregate jenseits natürlicher Limitierungen, so konnten beispielsweise Peptide durch den Einbau von metallkomplexierenden Aminosäuren via Ga^{3+} -Zugabe im wässrigen System reversibel trimerisiert werden. Durch punktuelle Alanin-Mutation konnte ein detailliertes, dreidimensionales Bild der Peptidstruktur entwickelt werden.

Einordnung der Relevanz der Arbeit

Exponierte Bereiche von Proteinoberflächen, wie beispielsweise β -*hairpins*, sind relevant für posttranslationale Modifikationen und biomolekulare Erkennungsprozesse. Im Rahmen dieser Arbeit konnten β -*hairpin* Peptide des eif5a-Proteins entwickelt und auf ihre biologische Wirksamkeit mittels Durchflusszytometrie charakterisiert werden, wobei gezeigt werden konnte, dass die entwickelten Peptide eine hohe Affinität gegenüber Monozyten aufweisen. Diese Beobachtung ermöglicht es, die Peptide als Transportsystem für molekulare Tuberkulose-Wirkstoffe zu nutzen. In konfokalen Mikroskopie-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die dargestellten eif5a-Hybridpeptide eine spezifische Reaktion im Zytoskelett auslösen, was die bisherige Vermutung über die Existenz eines eif5a-sensitiven Rezeptors bestätigt. Der Nachweis dieser Existenz ist für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe unerlässlich.

Abstract

Within the scope of this work peptides derived from the eif5a-protein were synthesized in such a manner that these peptides showed a fixed β -*hairpin* conformation in solution. The so derived peptides were then tested for their biological effects via confocal microscopy and flow cytometry. In flow cytometry experiments the peptides showed a high affinity towards monocytes, bearing the opportunity of using these structures as potential tuberculosis drugs. Structural elucidation was performed by modern 2D-NMR techniques. Furthermore it was investigated how structure and size have an impact on the dynamic and rigidity of the peptide epitopes in solution. While increasing the peptides sizes, five cysteine residues could be incorporated and still result in a regioselective, intramolecular disulfide oxidation. Modular mutations via the incorporation of new functional amino acids lead to the syntheses of supramolecular aggregates, for instance the use of metal-chelating amino acid allowed the reversible trimersation of peptide residues in aqueous media by the addition of Ga^{3+} . Punctual Alanine-mutations allowed the development of a detailed, threedimensional structure of these peptides.

Significance Statement

Exposed regions of protein surfaces like β -*hairpins* are relevant for posttranslational modifications and molecular recognition. Within the scope of this work β -*hairpin* peptides of the eif5a-protein were developed and biologically tested via confocal microscopy and flow cytometry. In flow cytometry experiments on peripheral mononuclear blood cells it was shown that the peptides have a high affinity towards monocytes, bearing the opportunity of using these peptides as a carrier system for molecular tuberculosis drugs. In confocal microscopy experiments on Jurkat 2D10 HIV-cells it was proven that the peptides caused a specific reaction within the cytoskeleton, which fortifies the to date assumption of the existence of an eif5a-selective cellreceptor. The verification of this receptor is prone for the development of new medications.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Jan Reutzel, Timm Marian Diogo, Armin Geyer

Reversible Folding of a β -hairpin peptide by a metal chelating amino acid

Chem. Eur. J. **2017**, 23, 8450-8456.

DOI 10.1002/chem.201700698

Jan Reutzel, Dennis Michael Klee, Sukwinder Singh, Hartmut Hanauske-Abel, Curtis Dobrowolski, Jonathan Karn, Armin Geyer

Cyclic β -hairpin fragments of eukaryotic translation initiation factor 5a preferentially target phagocytic peripheral mononuclear blood cells

25th American Peptide Symposium 2017, Whistler, British Columbia, Kanada.

Jan Reutzel, Dennis Michael Klee, Sukwinder Singh, Hartmut Hanauske-Abel, Curtis Dobrowolski, Jonathan Karn, David MacDonald, Valentina Guerrini, Maria Gennaro, Armin Geyer

Eif5a constructs for targeting professional phagocytic cells

Provisional Patent (USA), **2017**, Application: 62518531 EFS ID: 29473051.

Jan Reutzel, Timm Marian Diogo, Armin Geyer

Reversible Folding of a β -hairpin peptide by a metal chelating amino acid

26th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress 2017, Regensburg.

“The strongest among you may not wear a crown“

Kenianisches Sprichwort

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der eukaryotische Translations-Initiierungsfaktor 5a	2
1.1.1. Mechanismus der Desoxyhypusin-Synthese	4
1.1.2 Struktur und Inhibition von DHS	6
1.1.3 Struktur und Inhibition von DOHH	10
1.1.4 Die Struktur von eif5a als medizinisches Target	14
1.2. β -hairpin Peptide – Design und Strukturaufklärung	16
1.2.1. β -turns	16
1.2.2 NMR-Spektroskopie	16
1.3 Durchflusszytometrie	21
1.3.1 Allgemeine Einführung	21
1.3.2 Durchflusszytometrie im Jurkat E6/2D10 System	25
2. Aufgabenstellung	26
3 Synthese neuer Deferipron-Derivate	28
4. Design der eif5a basierten β-hairpin Peptide	36
4.1 Charakterisierung des β -turns in P2	46
4.2 D-konfigurierte Aminosäuren des β -turns	50
4.3 Quantifizierungen der Faltungspopulation bei Mutation im <i>turn</i> -Bereich	53
4.4 Alanin-Mutationen des GKHG-Motivs	54
4.5 Thioamide im <i>hairpin</i> -Motiv	57
4.6 N-Methylierung im <i>hairpin</i> -Motiv	67
4.7 Variation des Anteils des hydrophoben Clusters	73
4.8 pH-Abhängigkeit der Faltung des β -hairpins	78
4.9 Das KH- <i>turn</i> Motiv im Vergleich mit bekannten <i>turn</i> -Motiven	80
4.10 Vergrößerung des β -hairpins	84
4.11 Epitop-Oligomerisierung mittels Metalkomplexierung	89

4.11.1 Synthese der Hydroxypyridon-funktionalisierten Aminosäure	89
4.11.2 Metallkomplexierende Eigenschaften der Aminosäure	92
4.11.3 Metallkomplexierende Peptide	94
5. Anwendung der Peptide in der Durchflusszytometrie	98
5.1 Anbringung eines Fluoreszenzmarkers am β - <i>hairpin</i> Peptid	98
5.2 Fluoreszenz markierte Peptide im Jurkat 2D10 HIV-System	100
5.3 Konfokale Mikroskopie an Jurkat E6-Zellen	104
5.4 Durchflusszytometrie mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes	109
5.5 Konkurrenzexperimente an mononukleären Zellen des peripheren Blutes	117
5.6 Medizinische Relevanz des Bindungsverhaltens der Peptide	121
5.7 Anbindung eines Tuberkulose Wirkstoffes an β - <i>hairpin</i> Peptide	122
5.7.1 Kovalente Anbindung von Levofloxacin	123
5.7.2 Reversible Anbindung von Levofloxacin und Cycloserin	124
6. Modifizierung der Lys⁷-Seitenkette	130
6.1 Synthese von Hypusin-haltigen Peptiden	130
6.2 Synthese von Desoxyhypusin-haltigen Peptiden	135
6.3 Maltol Funktionalisierung der Lys ⁷ -Seitenkette	142
6.4 Modifizierungen von Lys ⁷ -Seitenkette an der Festphase	155
7. Zusammenfassung und Ausblick	163
8. Summary and Outlook	166
9. Experimenteller Teil	169
9.1 Allgemeine Hinweise	169
9.2 Allgemeine Hinweise zur automatisierten Peptidsynthese	172
9.3 Durchflusszytometrie und Mikroskopie	173
9.4 Durchflusszytometrie an PBMCs	176
9.5 Synthesen in Lösung	177
9.5.1 Synthese der Deferipron-Derivate	177
9.5.4 Synthesen der Levofloxacin-/Cycloserin-Derivate	190

9.5.5. Synthese der Hypusin-Derivate.....	194
9.5.6 Synthesen der Desoxyhypusin-Derivate.....	201
9.5.7. Synthesen der Maltosin-Derivate	211
9.5.8 Synthese modifizierter Carbonsäuren.....	223
10. Literatur	295

Abkürzungsverzeichnis

2-CTC	2-Chlortritylchlorid
Abs.	Absorption
AML	Akute myeloische Leukämie
AIBN	Azobis(<i>isobutyronitril</i>)
BiPy	2,2'-Bispyridyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CC	<i>cell count</i> , eng. Zellzahl
CD	Circulardichroismus
COSY	<i>correlated spectroscopy</i> , eng. Korrelations-Spektroskopie
CSD	<i>chemical shift deviation</i> , eng. Chemische Verschiebungsabweichung
DBAD	Di- <i>tert</i> butylazodicarboxylat
DC	Dünnschichtchromatographie
DBU	1,8-Diazobicyclo-[5.4.0]-undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DEE	Diethylether
DHS	Desoxyhypusinsynthase
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIC	<i>N,N</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOHH	Desoxyhypusinhydroxylase
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylamino)carbodiimid
ECF	Ethylchloroformiat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , eng. Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest

FBS	fetales Kälberserum (Hitze inaktiviert)
FC	Durchflusszytometrie, eng. Durchfluss-Zytometrie
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FSC	<i>foward scatter</i> , eng. Vorwärts gestreutes Licht
GA	Gallussäure
GC7	<i>N</i> 1-Guanyl-1,7-Diaminoheptan, DHS-Inhibitor
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure, biochemisches Puffersystem
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i> , eng. Heterokern Mehrbindungs-Korrelation
HMDS	1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazid
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Hot=Tap	Hydroxythreonin-Thiaprolin, Dipeptid-Mimetikum
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> , engl. Hochaufgelöste Massenspektrometrie
IBCF	<i>Isobutylchloroformiat</i>
nJ	skalare Kopplung über n Bindungen
LAH	Lithiumaluminiumhydrid
Levo	Levofloxacin, Tuberkulose-Medikament
LR	<i>Lawessons Reagenz</i>
LCMS	Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie
MDR-TB	multiresistente Tuberkulose
<i>mcpba</i>	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
NA	Nikotinsäure
NADH	Nikotinamid-Adenindinukleotid
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid

NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , engl. Kernspinresonanz
NOE	<i>nuclear-overhauser-effect</i> , engl. Kern-Overhauser-Effekt
NOESY	<i>nuclear overhauser enhanced spectroscopy</i> , engl. Kern-Overhauser-Effekt verstärkende Spektroskopie
Nor	Normocin
Ns	2-Nitrobenzosulfonyl
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	Phosphatgepufferte Salinlösung, biochemisches Puffersystem
PDB-ID	Identifikationsnummer in der Protein-Datenbank
PI	Propidiumiodid
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , engl. periphere Zellen des mononukleären Blutes
ppb	<i>parts per billion</i> , engl. Teile pro Billion, NMR
ppm	<i>parts per million</i> , engl. Teile pro Million, NMR
<i>p</i> -TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
RA	Rheumatoide Arthritis
rc	<i>random coil</i> , engl. ungefaltet
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
ROE	<i>rotating frame nuclear overhauser effect</i> , engl. im rotierenden Koordinatensystem auftretender Kern-Overhauser-Effekt
RP	<i>reverse phase</i> , engl. Umkehrphase
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SSC	<i>side scatter</i> , engl. Seitwärts gestreutes Licht
TBAI	Tetra- <i>n</i> -butyl-ammoniumiodid
TB	Tuberkulose
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butyl
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl

TFA	Trifluoressigsäure
TFFA	Tetramethylfluoroamidinium-Hexafluorophosphat
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TNF	Tumor-Nekrosefaktor α
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i> , engl. totale Korrelations-Spektroskopie
Trt	Triphenylmethyl, Trityl
TSP	Natrium-(Trimethylsilyl)-propionat-d ₄ , NMR-Standard
Watergate	<i>water suppression by gradient tailored excitation</i>
Xaa	beliebige Aminosäure

Aminosäure-Verzeichnis

Ahx		6-Aminohexansäure
Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Ava		5-Aminovaleriansäure
Cit		Citrullin
Cys	C	Cystein
Csd		Cycloserin (4-Amino- <i>isooxazolidinon</i>)
Dab		2,4-Diaminobuttersäure
Dap		2,3-Diaminopropansäure
Dpa		β,β -Diphenylalanin
Dhu		Desoxyhypusin
DSc		D-Ornithin Side Chain, Dipeptid-Mimetikum
GABA		4-Aminobuttersäure
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Hop		5-(1-Hydroxy-pyridin-2(1 <i>H</i>)-onyl)-alanin
Hpu		Hypusin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Mal		Maltosin

Met	M	Methionin
Mim		Mimosin
1-Nal		1-Naphthylalanin
2-Nal		2-Naphthylalanin
Orn		Ornithin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Sar		Sarkosin, <i>N</i> -Methylglycin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

1. Einleitung

Natürliche und synthetische Peptide nehmen im Alltag unterschiedlichste Rollen ein. Ihr Anwendungsbereich reicht von Hormonen und Neurotransmittern über Süßstoffe und Schlangengifte bis hin zum Medikament. Diese diversen Funktionen werden durch die strukturelle und funktionelle Vielfalt von Peptiden ermöglicht, so dass beispielsweise die zufällige Verknüpfung von sechs Aminosäuren in der Kombination die Darstellung von 64 Millionen unterschiedlichen Hexapeptide zulässt. Ein Peptid, welches bereits als Medikament im klinischen Alltag etabliert ist, ist das zyklische Peptid Octreotid, welches zur Behandlung von Magen-Darm-Karzinomen eingesetzt wird.^[1–3]

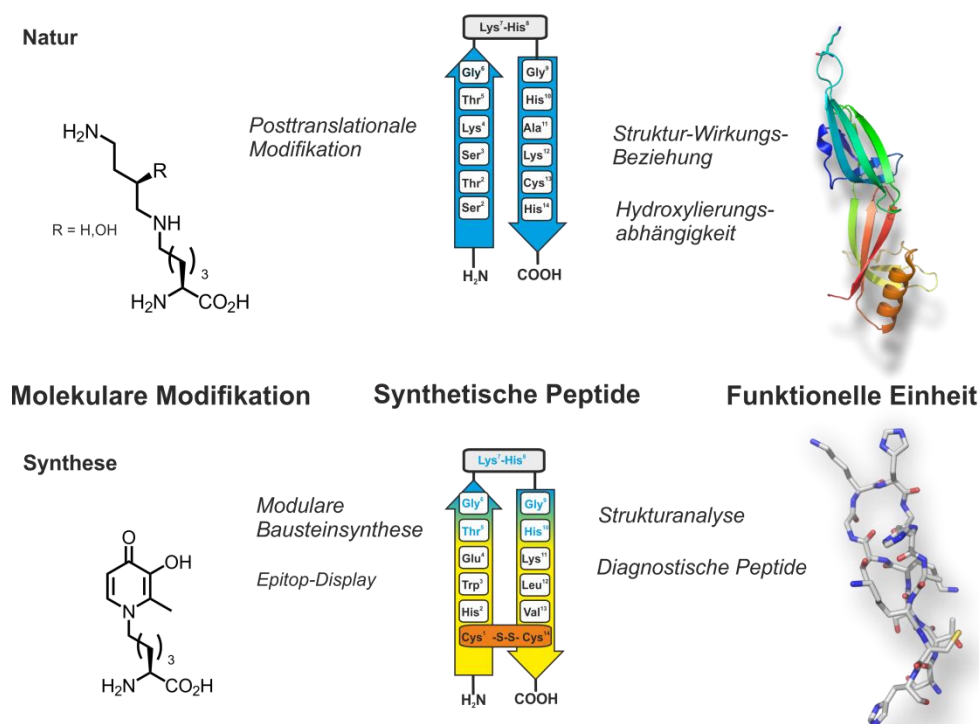


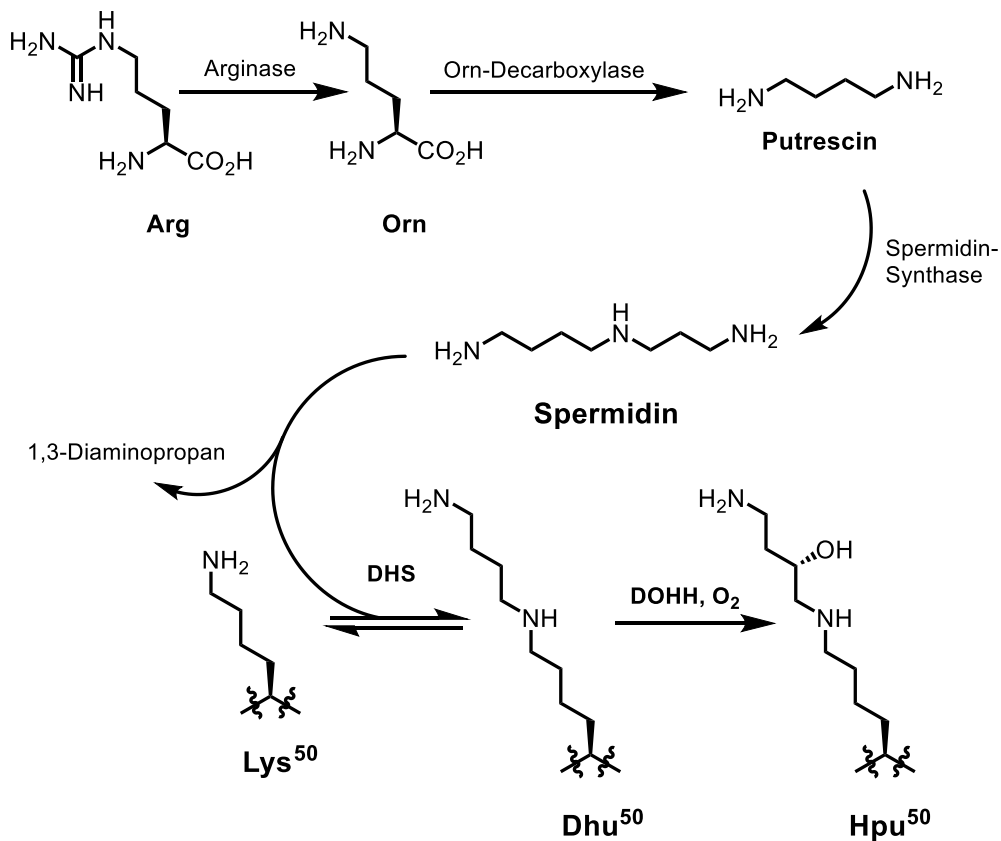
Abbildung 1-1: Durch manuelle Synthese des Ser⁴⁴-His⁵⁷-Peptidfragments des eif5a-Proteins verliert dieses Fragment die biologische Aktivität des Proteins (blau). Durch Vereinigung des eif5a-Epitops mit dem hydrophoben Cluster (gelb) nach Cochran *et al.* wird ein konformationell stabiles Epitop erhalten.^[4] Werden in dieser entwickelten Peptidsequenz zusätzlich neue, nicht-proteinogene Aminosäure-Bausteine angewendet, wie Desoxyhypusin, Hypusin oder ein Maltol-funktionalisiertem Lysin-Derivat, so kann eine Information darüber liefern, inwiefern das biologische Signal vom Grad der posttranslationalen Modifikation abhängig ist.

Bei Octreotid handelt es sich dabei um ein 14 Aminosäure langes Disulfid-Peptid, welches ein synthetisches Analogon des Peptidhormons Somatostatin darstellt. Während Octreotid in

Lösung nachweislich eine β -*hairpin*-Struktur aufweist, kann diese Struktur für das gesamte Hormon nur im konformationellen Gleichgewicht gefunden werden. Diese Sekundärstruktur ist für die zytoprotektiven Eigenschaften notwendig und die Erkennung dieser Struktur erfolgt über wohldefinierte Regionen der Peptid- bzw. Proteinoberfläche, die als konformationelles Epitop bezeichnet wird. Am Stärksten exponiert ist eine Peptidsequenz in einem β -*turn*, weshalb viele Erkennungssequenzen und Epitop-Strukturen innerhalb einer solchen Sekundärstruktur fixiert sind. Ein β -*turn* wird von bis zu vier kanonischen Aminosäuren ausgebildet. Dabei kann keine allgemeine Aussage darüber getroffen werden, dass die Rigidität bzw. Flexibilität der Epitop-Region direkt mit der biologischen Wirksamkeit korreliert. Im Falle des Octreotids kann, da der biologische Effekt mit der Rigidität des Epitops einhergeht, die Wechselwirkung mit dem Schlüssel-Schloss-Prinzip erklärt werden.^[5-7] Im Rahmen dieser Arbeit sollte, analog zum Octreotid, das biologisch relevante Epitop eukaryotischen Translations-Initiierungsfaktors 5a (eif5a) synthetisch in einer β -*hairpin* Struktur fixiert werden. Dazu sollte anhand veröffentlichter Kristallstrukturen die relevante Epitop-Region dieses Proteins identifiziert und durch etablierte synthetische Methoden in einer β -*hairpin*-Struktur festgehalten werden. Durch den Aufbau formstabiler β -*hairpin* Peptide und der daraus resultierenden Rigidität bzw. Flexibilität des eif5a-Epitops sollte ein biologischer Effekt generiert werden. Es bedarf diverser chemischer Lösungsansätze, um Peptide bzw. Proteinfragmente in ihrer natürlichen Form zu fixieren, was beispielsweise durch Disulfid-Bildung^[8,9], Makrolacton- bzw. Makrolactamisierung^[10] oder Click-Chemie^[11-13] erfolgen kann. Während die Natur durch die Torsionswinkelpräferenzen der kanonischen Aminosäuren in der Epitop-Region nur bestimmte Geometrien zulässt, kann die organische Chemie durch zusätzliche, meist zyklische Restriktionen einen direkten Einfluss auf Struktur und Dynamik der Region nehmen. Durch Optimierung von Struktur und Dynamik, deren Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie erfolgte, sollten Epitope generiert werden, welche die publizierten Kristallstrukturen des unmodifizierten Proteins in der Epitop-Region nachahmen. Anwendung der Peptide in der konfokalen Mikroskopie, als auch in der Durchflusszytometrie sollten dann direkte Beziehungen zwischen biologischem Effekt und der Struktur bzw. Dynamik der Epitop-Region liefern. Die Synthese von SPPS geeigneten Bausteinen des posttranslational-modifizierten Lysin-Derivats Hypusin sollte zusätzlich Aufschluss darüber geben, inwiefern diese Modifikation für die biologische Funktion relevant ist (Abbildung 1-1).

1.1 Der eukaryotische Translations-Initiierungsfaktor 5a

Beim eukaryotischen Translations-Initiierungsfaktor 5a (eif5a) handelt es sich um 16 kDa schweres, saures Protein, das mit Ausnahme von Eubakterien in allen Lebensformen hochkonserviert ist.^[14–17] Die kritische Funktion des Proteins ist unbekannt, jedoch wird es unter anderem mit Proteinbiosynthese^[17,18], mRNA-Degradation und dem mRNA-Transport zwischen dem Zellkern und Zytoplasma in Zusammenhang gebracht.^[19–27] Dabei stimuliert das Protein die Methionyl-Puromycin-Synthese^[27], nimmt also Einfluss auf die Bildung der ersten Peptidbindung und beschleunigt somit die Translations-Elongation.^[28] Während lange Zeit eif5a als klassischer Translations-Initiierungsfaktor wahrgenommen wurde, zeigen aktuelle Studien, dass eif5a selektiv nur translatierende Ribosomen bindet.^[14,29] Eif5a ist dabei das einzig bekannte zelluläre Protein, welches die nicht-proteinogene Aminosäure Hypusin trägt. Der Name leitet sich dabei von **Hydroxy-Putrescyl-Lysin** ab. Hypusin wurde erstmals 1971 von *Shiba et al.* in Rinderhirn nachgewiesen.^[30] Hypusin wird dabei ausgehend vom Lysin-Vorläufer des eif5a-Proteins und dem Polyamin Spermidin in einer zweistufigen Reaktion synthetisiert. Im ersten Schritt katalysiert die Desoxyhypusinsynthase (DHS, EC 2.5.1.46) den Transfer des 4-Aminobutyl-Restes des Spermidins auf das ϵ -Amin eines spezifischen Lysins, welches Lys⁵⁰ im menschlichen Protein entspricht. Die Transferase ist dabei von der Präsenz von NAD⁺ abhängig.^[31] Nachfolgend wird das Desoxyhypusin-Intermediat durch die Desoxyhypusin-Hydroxylase (DOHH; EC 1.14.99.29) und molekularem Sauerstoff stereoselektiv an der θ -Position hydroxyliert (Schema 1-1). Als L-Hypusin wird dabei immer das (*S*)-Enantiomer der L-Aminosäure bezeichnet, andere Enantio- bzw. Diastereomere sind unbekannt. Die Biosynthese des Hypusins auf Basis des Spermidins nimmt eine zentrale Rolle in der Zellproliferation ein.^[17,32,33] Es konnte in einer zentralen Arbeit eindeutig nachgewiesen werden, dass alleine Spermidin und nicht Spermin einen direkten Einfluss auf die Hypusin-Biosynthese nimmt.^[34]

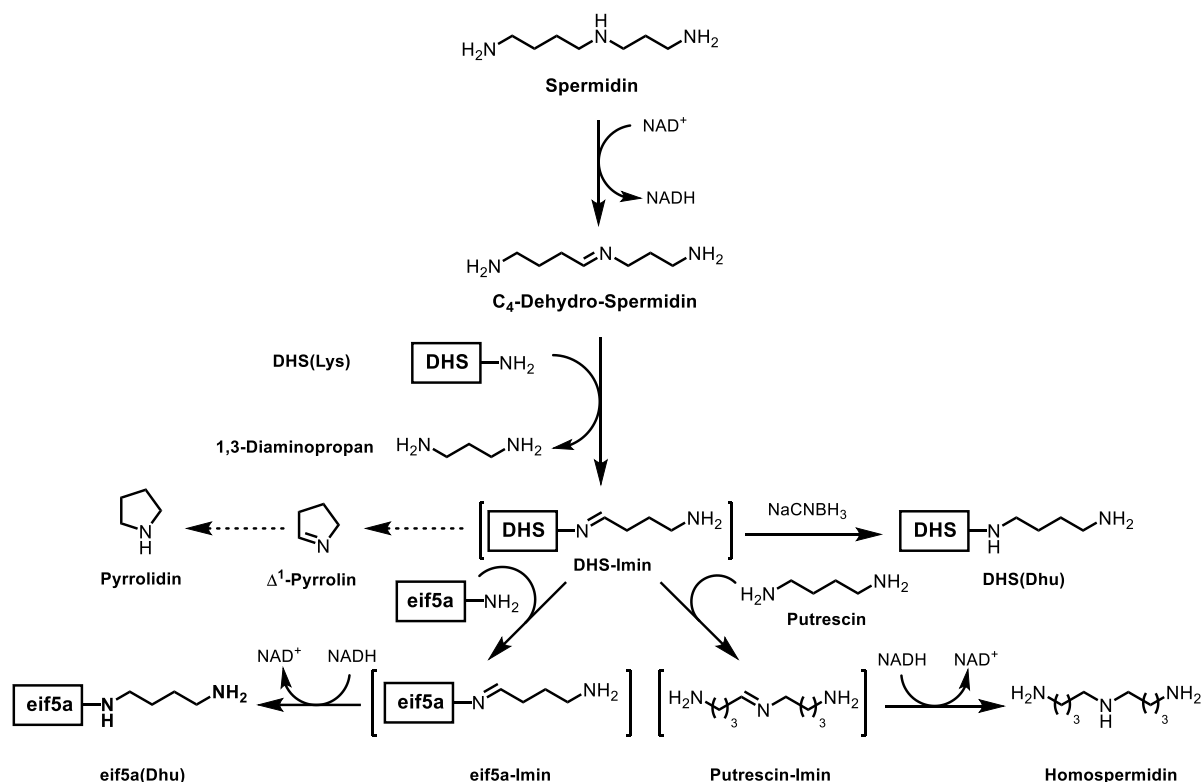


Schema 1-1: Biosynthese des hypusinierten eif5a: Ausgehend vom Lysin⁵⁰-Vorläufer erfolgt der Transfer einer 4-Aminobutyl-Einheit des Spermidins auf die Lys-Seitenkette, katalysiert durch das Enzym Desoxyhypusinsynthase (Dhu). Stereoselektive Oxidation durch die Desoxyhypusinehydroxylase (DOHH) mit molekularem Sauerstoff liefert schließlich das Hypusin-haltige Protein.

1.1.1. Mechanismus der Desoxyhypusin-Synthese

DHS katalysiert eine komplexe Reaktionssequenz, bei der aus Spermidin und der Lys⁵⁰-Form des eif5a-Proteins und NAD⁺ als Cofaktor eine spezifische Lysin-Seitenkette zum Desoxyhypusin umgesetzt wird. Das Enzym zeigt dabei eine hohe Spezifität, sowohl gegenüber dem Protein-Substrat, als auch der Polyamin-Quelle Spermidin.^[31] Studien, bei welchen vom Protein abgeleitete Peptidsequenzen auf ihre Substratwirkung untersucht wurden, zeigten, dass erst Peptide größer der Sequenz Gly³⁰-Cys⁸⁰ vom Enzym als Substrat erkannt werden.^[35] Als Messmethode zur Bestimmung des Reaktionsumsatzes am Enzym der Synthese hat sich ein Radioimmunoassay etabliert, bei welchem das Protein mit [1,8-³H]-markierten Spermidin am Enzym umgesetzt wird. Nach Proteinaufreinigung mittels Ionen-Austausch-Chromatographie oder SDS-Page liefert die gemessene Radioaktivität eine Aussage über den Reaktionsumsatz.^[36–39]

Bei Abwesenheit des Lys⁵⁰-eif5a-Proteins zeigte das Enzym eine mögliche Nebenreaktion, bei welcher Spermidin zu 1,3-Diaminopropan und Δ^1 -Pyrrolin umgesetzt wird (Schema 1-2).^[21,25,40] In einer weiteren Studie wurde das gelabelte Desoxyhypusin-haltige Protein eif5a([³H]Dhu) in Gegenwart von NADH und 1,3-Diaminopropan inkubiert, was zu einem Verlust der Radioaktivität im Protein führte. Die Freisetzung der Protein-gebundenen Radioaktivität war dabei abhängig von der Präsenz des Enzyms, als auch von der zugegebenen Konzentration an 1,3-Diaminopropan. Die Radioaktivität konnte im freigesetzten Spermidin detektiert werden. Da keine Protease-Inhibitoren zugesetzt wurden, konnte der proteolytische Abbau des Proteins als mögliche Ursache der Freisetzung der Radioaktivität ausgeschlossen werden. Weitergehend war das beobachtete Phänomen auf die Desoxyhypusin-haltige Form des Proteins limitiert. Für das oxidierte Protein eif5a([³H]Hpu) konnte kein Verlust der Protein-gebundenen Radioaktivität gemessen werden. Dies lässt den Rückschluss zu, dass es sich bei der Synthase-Reaktion um einen reversiblen Prozess handeln muss. In Anwesenheit des 1,3-Diaminopropan konnte kein zusätzliches Δ^1 -Pyrrolin identifiziert werden. Diese Ergebnisse, sowie die NAD⁺-Abhängigkeit der Reaktion, lassen davon ausgehen, dass im ersten Schritt dieser Reaktion C₄-Dehydro-Spermidin involviert ist. Um nachzuweisen, dass der Transfer des 4-Aminobutyl-Restes eine kovalent gebundene, enzymatische Zwischenstufe durchläuft, wurde das Desoxyhypusin-haltige Protein mit NAD⁺ und dem Enzym inkubiert. Aufgrund der bekannten Reversibilität der Reaktion konnte sich bei Ausbildung eines kovalent-gebundenen Enzym-Aminobutylkomplexes die entsprechende Imin-Zwischenstufe ausbilden, die sich dann durch Zugabe von NaCNBH₃ als Reduktionsmittel zum Amin reduzieren ließ.^[41,42] Durch Sequenzierung des tryptischen Proteins konnte Lys³²⁹ als Position der Iminbildung für die humane Synthase identifiziert werden.^[43] Die kritische Rolle dieser Position konnte durch Mutagenese-Studien verifiziert werden. Hierbei zeigten die Mutanten K³²⁹R und K³²⁹A keinerlei Aktivität, obwohl beide Mutanten in der Lage waren den eif5a-Vorläufer zu binden.^[36,41] Hartmann *et al.* berichteten, dass die aus Tabakpflanzen isolierte Synthase in der Lage ist, Putrescin als alternativen Butylamin-Akzeptor anzuwenden, was in der Synthese von Homospermidin resultierte.^[39] Diese Beobachtung konnte auf die humane DHS übertragen werden, wobei jedoch der entsprechende K_m Wert für Putrescin (1.1 mM) deutlich höher liegt im Vergleich zum Spermidin (1.5 μ M). Im Gegensatz zu eif5a([³H]Dhu) konnte auch hier für eif5a([³H]Hpu) keine Reversibilität festgestellt werden, was die Oxidation zu einer irreversiblen Proteinmodifikation macht. Der aus diesen gesamten Untersuchungen vorgeschlagene Mechanismus ist in Schema 1-2 gezeigt.^[31]



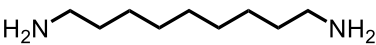
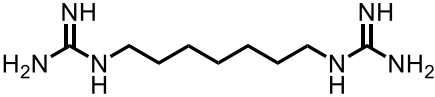
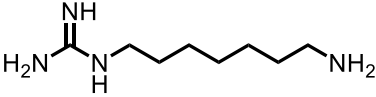


Schema 1-2: Postulierter Mechanismus der Biosynthese von eif5a(Dhu): Ausgehend von Spermidin wird dieses zunächst oxidiert, bevor das C₄-Dehydro-Spermidin unter der Freisetzung von 1,3-Diaminopropan ein Imin mit einer Lys-Seitenkette der DHS ausbildet. Als reaktive Position konnte dabei Lys³²⁹ identifiziert werden.^[31,35] In Abwesenheit von eif5a(Lys) konnte dieses Intermediat durch Zugabe von NaCNBH₃ reduziert und als DHS(Dhu) isoliert werden. Auch Pyrrolidin konnte als Reduktionsprodukt nachgewiesen werden.^[35,43] Wurde statt eif5a(Lys) Putrescin hinzugefügt, so wurde Homospermidin erhalten. Bei Zugabe von eif5a(Lys) wird eine Trans-Iminierung angenommen, bevor das resultierende eif5a-Imin zu eif5a(Dhu) reduziert wird.

1.1.2 Struktur und Inhibition von DHS

Bevor Kristallstrukturen der Synthese bekannt waren, wurde in einer Studie die *active site* des Enzyms durch Spermidin- und Polyamin-Analoga untersucht. Dabei konnte herausgefunden werden, dass zur Inhibition zwei basische funktionelle Gruppe im Abstand von sieben bis acht Methylen-Einheiten nötig sind (Tabelle 1-1). Derivate mit sterisch anspruchsvollen Resten im Methylen-Rückgrat und sekundäre Amine zeigten keine Inhibition *in vitro*. Die stärksten Inhibitionswerte konnten für N1-Guanidyl-1,7-diaminoheptan (GC7) und dessen methyliertes Analogon erhalten werden (Tabelle 1-1). Im Vergleich zu Spermidin ($K_m = 7.20 \mu\text{M}$) und 1,7-Diaminoheptan ($K_i = 5.60 \mu\text{M}$) konnte für GC7 ein $K_i = 0.01 \mu\text{M}$ bestimmt werden.^[35,44–46] GC7 führte zur Inhibition der Zellproliferation für Mammalia-Zellen, sowie für einige Krebszellen.^[47]

Tabelle 1-1: Inhibition der DHS mit Diamin- und *Bis*(guanidyl)-Alkyl-Derivaten. Eine basische Funktionalität ist an beiden Kettenenden nötig. Die entsprechenden Mono-Amin bzw. Mono-Guanidyl-Derivate zeigten nur unzureichende Inhibition. Während bei den Diamin-Derivaten mit sieben Methylenheiten das Minimum gefunden wurde, wurde dieser Wert für das Mono-guanidierte-Derivat GC7 noch deutlich unterschritten.^[44]

Inhibitor	IC ₅₀ / μM	K _i / μM
	6.3	4.0
	8.1	5.6
	216	159
	48	95
	0.017	0.097

Bis zur Publikation der ersten Kristallstruktur im Jahre 1998 (Abb 1-2) war die *active site* des Enzyms nicht biochemisch charakterisiert, noch war etwas über die Stöchiometrie der Substrat-Anbindung bekannt.^[40,48–50] Die native Form des Enzyms existiert als Tetramer bestehend aus vier identischen Untereinheiten von 40 kDa bis 43 kDa in 222 Symmetrie.^[50–52] Das Tetramer umfasst zwei assoziierte Dimere mit zwei *active sites*, die sich jeweils an den Trennfläche der Dimere befinden. Jede Untereinheit umfasst sechs parallele, ein anti-paralleles β -Faltblatt und 16 Helices. Die gesamte Anordnung jeder Untereinheit entspricht dabei dem *Rossmann-Dinucleotid-Bindungsmotiv*, welches oft in Dehydrogenasen zu finden ist.^[53] Da die Kristallisation der in Abbildung 1-2 gezeigten Struktur bei pH 4.5 und hoher Ionenstärke (1.7 M Phosphat) erfolgte, war es den Autoren nicht möglich, NAD⁺ bzw. GC7 in der *active site* zu kokristallisieren. In einem *in vitro* Essay zeigte die erhaltene Struktur keinerlei Aktivität.

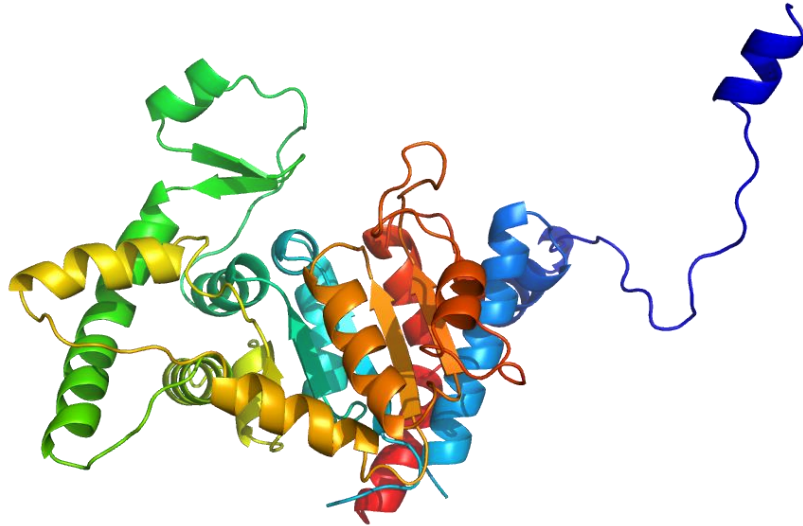


Abbildung 1-2: Kristallstruktur der tetrameren Desoxyhypusin-Synthase, die Kristallisation erfolgte bei niedrigem pH-Wert und hoher Ionenstärke (pdb: 1dhs).^[48]

Im Jahre 2004 lieferte die Kristallisation des Enzyms bei physiologischem pH-Wert und deutlich niedrigerer Ionenstärke eine Kristallstruktur, die auch *in vitro* Aktivität aufzeigte (Abbildung 1-3).

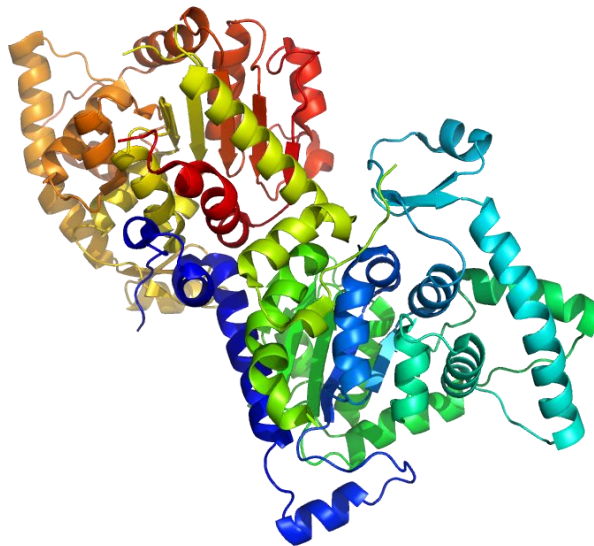


Abbildung 1-3: Kristallstruktur der tetrameren Desoxyhypusin-Synthase, die Kristallisation erfolgte bei niedrigem pH-Wert und hoher Ionenstärke. Cokristallisation mit NAD⁺ (pdb: 1roz).^[48]

Während in der ersten Kristallstruktur die *active sites* durch eine von den Autoren als *ball and chain*-Motiv beschriebene Struktur (Ala¹¹-Val¹⁷) N-terminal den Zugang des Substrats blockierte, konnte in der aktuellen Struktur des Holoenzym DHS:NAD⁺ dieses Motiv nicht wiedergefunden werden, was direkt mit *in vitro* Aktivität korrelierte.^[54] Zusätzlich konnte auch das Holoenzym DHS:NAD⁺ mit dem Inhibitor GC7 kristallisiert werden. (Abbildung 1-4).

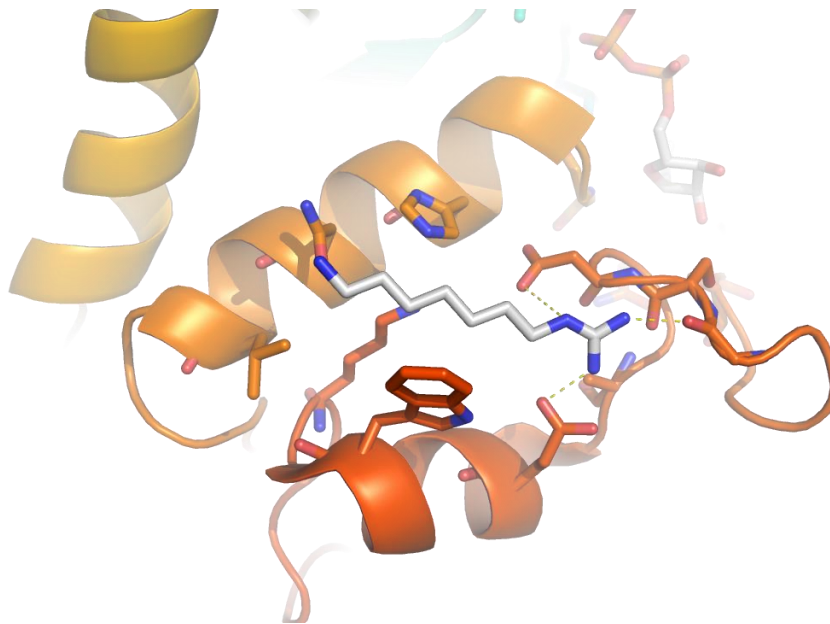


Abbildung 1-4: Kristallstruktur der Desoxyhypusin-Synthase: Der kompetitive Inhibitor GC7 konnte gemeinsam mit NAD⁺ kokristallisiert werden. Die Kristallisation erfolgte bei niedrigem pH-Wert und hoher Ionenstärke. Kokristallisation mit NAD⁺. (pdb: 1rqd).^[48]

Auf der Basis dieser Kristallstruktur wurden weitere theoretische Berechnungen durchgeführt, die jedoch bis heute keinen potenteren Inhibitor als GC7 hervorgebracht haben.^[55–57]

1.1.3 Struktur und Inhibition von DOHH

Im Gegensatz zu DHS ist zur DOHH nur wenig bekannt. Es handelt sich hierbei um ein nicht-Häm-basierendes Dieisen-Enzym, welches unter Verwendung von molekularem Sauerstoff stereoselektiv eif5a(Dhu) an der θ -Position von Dhu⁵⁰ hydroxyliert. (Schema 1-1). Diese posttranslationale Modifikation ist für den nuklearen Export spezifischer mRNAs essentiell.^[58] 2006 wurde auf der Basis von CD-Spektroskopie eine α -helixreiche Struktur vorausgesagt, die zur Familie der Heat-Proteine gehört^[31,59], was 2010 durch Kleinwinkelstreuung bestätigt werden konnte.^[60] Durch Mutagenese-Studien konnte herausgefunden werden, dass die Umgebung der beiden Eisenzentren zwei Histidin- und Glutaminsäure-haltige Koordinationssphären umfasst. Mößbauer-Spektroskopie zeigte zudem, dass es sich bei den beiden Eisen(III)zentren um High-Spin-Konfiguration handelt.^[61] 2015 wurde erstmals eine ausreichend aufgelöste Kristallstruktur des Enzyms erhalten, welche die Anwesenheit eines μ -1,2-Peroxo-Dieisen(III) aufzeigte.^[58] Die Gesamtstruktur des Enzyms ist in Abbildung 1-5 gezeigt. Es handelt sich dabei um zwei DOHH Monomere mit pseudosymmetrischer Anordnung einer *N*- und einer *C*-terminalen Domäne, wobei jede Domäne aus vier Heat-Einheiten besteht.

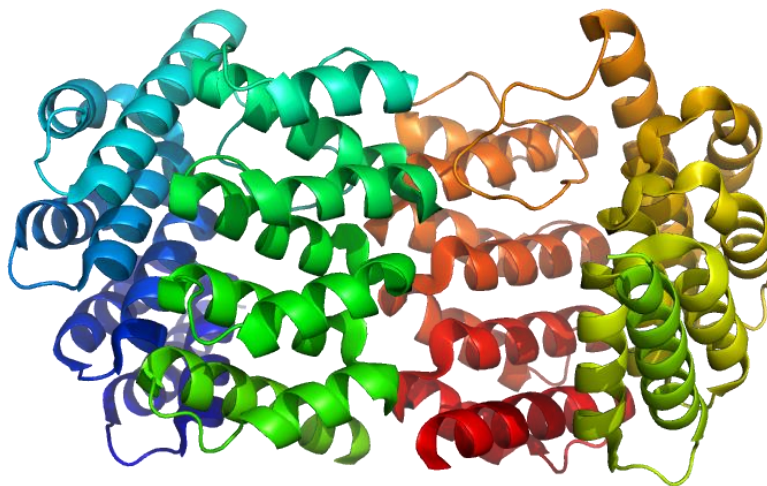


Abbildung 1-5: Kristallstruktur der Desoxyhypusin-Hydroxylase: Zwei DOHH Monomere kristallisierte in pseudosymmetrischer Anordnung jeweils einer *N*- und *C*-terminalen Domäne (pdb: 4d50).^[58]

Jedes der beiden Eisenatome ist von jeweils zwei Histidin- und einer Glutamat-Seitenkette umgeben (Abbildung 1-6). Fe^1 ist dabei von His^{89} , Glu^{90} und His^{207} koordiniert, während Fe^2 von den Seitenkette der Aminosäuren His^{56} , His^{240} und Glu^{241} komplexiert wird. Vorhergehende Mutagenese-Studien zeigten, dass alle diese Positionen für den Eisengehalt des Enzyms und damit für dessen Aktivität essentiell sind.^[62] Alle Liganden verhalten sich dabei monodentat, was dieses Enzym deutlich von anderen Dieisen-Enzymen unterscheidet.^[63] Die sekundäre Koordinationsphäre des Eisens kann in einer hydrophile und in eine hydrophobe Hemisphäre unterteilt werden. Während sich am Ende jeder Eiseneinheit zwei Glutamat-Einheiten ($\text{Glu}^{57}/\text{Glu}^{244}$ und $\text{Glu}^{93}/\text{Glu}^{208}$) befinden, wird das Eisenzentrum oberhalb von zwei wasserstoffbrücken-gebundenen Tyrosin-Resten ($\text{Tyr}^{60}/\text{Tyr}^{211}$) umgeben. Alanin-Mutationen der Glutamat-Position haben dabei keinen Einfluss auf den Eisengehalt und die Aktivität des Enzyms.^[64] In der hydrophoben Hemisphäre umschließen die Reste $\text{Leu}^{53}/\text{Leu}^{204}$ und $\text{Met}^{86}/\text{Met}^{237}$ gemeinsam mit den Eisen-koordinierenden His-Seitenketten (His^{56} , His^{89} , His^{207} , His^{240}) eine kleine Tasche, die unterhalb der Dieisen-Einheit den Peroxo-Liganden umfasst. Obwohl die Aminosäuren $\text{Met}^{86}/\text{Met}^{237}$ nicht direkt eines der Eisenzentren koordinieren, haben sie unmittelbaren Einfluss auf die Enzymaktivität. Während die Mutationen M^{86}A , $\text{M}^{86}\text{L}/\text{M}^{237}\text{L}$ zu einem signifikanten Eisenverlust führten, war dieser für die punktuelle Mutation M^{237}L deutlich geringer. Theoretische Berechnungen dazu zeigten, dass die Alanin-Mutation die Eisenzentren solventzugänglich macht, während dies für die Leucin-Mutation nicht der Fall ist (Abbildung 1-6).^[58]

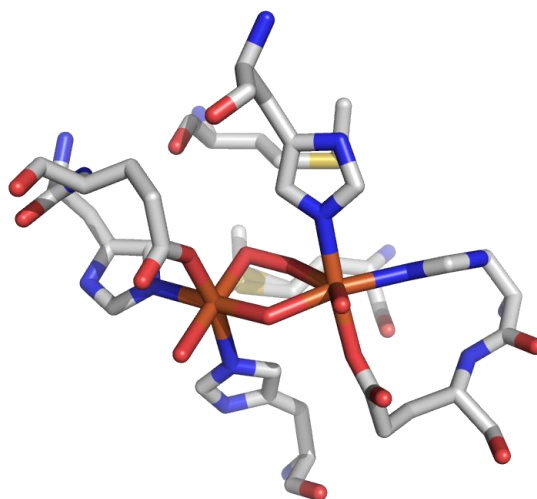


Abbildung 1-6: Bindungsmotiv des Dieisen(III)-Zentrums (orange) in humaner DOHH. Das Peroxo-Anion ist rot eingefärbt. In der ersten Koordinationssphäre wird jeweils ein Eisenatom von je zwei Histidin- und einer Glutaminsäure-Seitenkette monodentant komplexiert (pdb: 4d50).^[58]

Im Vergleich zu anderen Nicht-Häm basierenden Dieisen-Enzymen ist die Halbwertszeit des Peroxo-Dieisen(III) in DOHH erstaunlich hoch. Grund hierfür ist, neben der hydrophoben Abschirmung durch die Methione, die jeweils monodentate Koordination der Eisenzentren, was die elektronenschiebenden Eigenschaften der Eisenzentren zusätzlich schwächt.^[65]

Zur Entwicklung eines Strukturmodells der Bindung von eif5a(Dhu) in die *active site* der DOHH wurden Dhu und Hpu mittels *AutoDock* an das Enzym gebracht.^[66] Die Ergebnisse zeigten, dass das primäre Amin der Dhu-Seitenkette Wasserstoffbrücken mit den Seitenketten von Glu⁹³ und Glu²⁰⁸ eingeht, während das ϵ -Amin eine Wasserstoffbrücke mit Glu²⁴¹ eingeht (Abbildung 1-7).

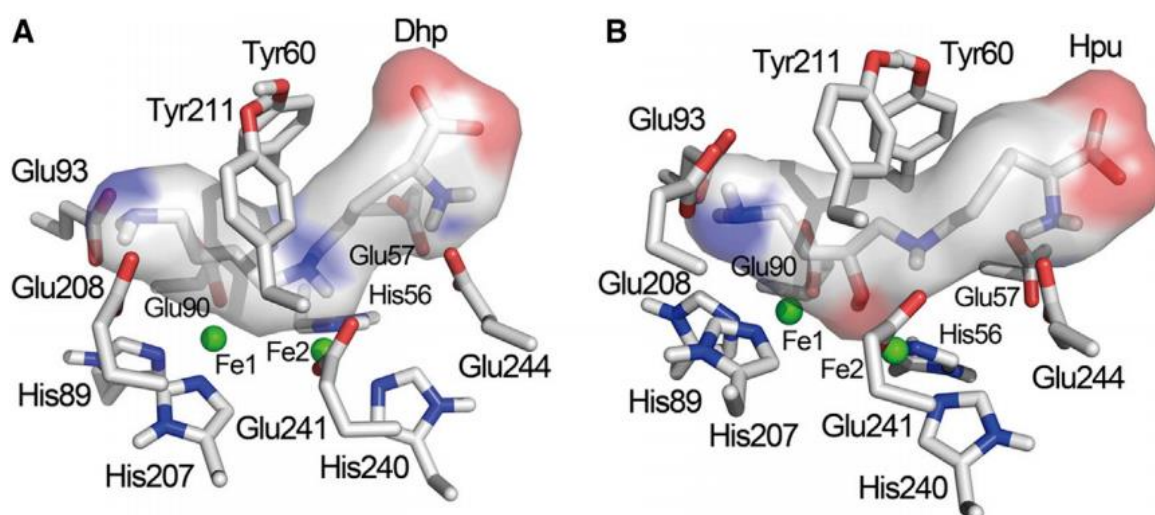


Abbildung 1-7: Docking-Strukturen des DOHH-eif5a(Dhu)-Substratkomplexes (A) und dem DOHH-eif5a(Hpu)-Komplex (B). Abbildung entnommen aus Hilgenfeld et al. *Structure* **2015**, 23, 882-892.^[58]

Im Vergleich zum DOHH-eif5(Dhu)-Substratkomplex, zeigt das Docking des DOHH-eif5a(Hpu) einige interessante Unterschiede: Die Wasserstoffbrücke von der terminalen, primären Aminen des Hpu geht nun eine Wasserstoffbrücke mit Glu⁹³ ein, während der sekundäre Alkohol der Hpu-Seitenkette eine Wasserstoffbrücke mit Glu⁹⁰ ausbildet. Nach Abschluss der Hydroxylierung bewegt sich der modifizierte Kohlenstoff zwischen beide Fe-Atome, seine relative Position liegt jedoch deutlich näher an Fe¹, was sich im Einklang mit den zuvor durchgeführten Mutagenese-Studien befindet.^[62]

Die Hydroxylierung des Desoxyhypusins durch DOHH erfolgt in einem G-Xaa-Yaa-G-Substratmotiv, analog zur Hydroxylierung von Prolin oder Lysin in Collagenen, weshalb DOHH auch durch einige literaturbekannter Collagen-Hydroxylierungs-Inhibitoren inhibiert werden kann.^[16] Sequenzen des Typs G-Xaa-Yaa-G werden also vom Enzym erkannt. 1989 wurden erstmals Peptidfragmente dieser Art als potentielle Inhibitoren von DOHH getestet, wobei keine signifikante inhibitorische Wirkung für die Nonapeptide des Typus Ac-KTGXHGHA-K-OH ($X = K, K_i > 2 \text{ mM}$, $X = Dhu, K_i > 0.3 \text{ mM}$) festgestellt werden konnte.^[21] Zwei Jahre später konnte durch Tripeptide des Typs Ac-Orn*-Pro-Gly-OH eine deutlich bessere Inhibition ausgelöst werden. In diesen Strukturen war die Seitenkette des Ornithins mit 2,3- bzw. 3,4-Dihydroxybenzoesäure acyliert. Für das 3,4-Dihydroxybenzoesäure-acylierte Peptid konnte ein $K_i = 0.03 \text{ mM}$ bestimmt werden. Der K_i -Wert dieser Peptid war signifikant niedriger als für das entsprechend nicht Seitenketten-modifizierte Peptid Ac-Orn-Pro-Gly-OH, als auch für den Ethylester der entsprechenden Benzoesäureethylester.^[16] 1998 konnte experimentell erstmals die Inhibition der DOHH durch Mimosin und Deferipron in T-Lymphozyten und promonozytischen Zelllinien nachgewiesen werden, was die Replikation von HIV-1 unterdrückte (Abbildung 1-8). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Übergang von der G_1 in die S-Phase im eukaryotischen Zellzyklus Hypusin-sensitiv ist. Die Inhibition der eif5a-Hydroxylierung durch die Pyridone L-Mimosin, Deferipron und Ciclopirox resultierte in einer reduzierten polysomalen Beladung der mRNA von HIV-1 und in einer herunterregulierten Biosynthese des p24-Proteins. Zusätzlich verstärken die beiden Chelatoren die Apoptose retroviral infizierter T-Lymphozyten und zeigen zudem ebenso inhibitorische Wirkung auf die Prolyl-4-Hydroxylase, was eine ähnliche Organisation in den *active sites* der Enzyme vermuten lässt.^[67,68] 2016 konnte die anti-Krebs-Aktivität von Ciclopirox in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und die anti-retrovirale Aktivität von Deferipron bei HIV-1-Infektionen nachgewiesen werden.^[69–71]

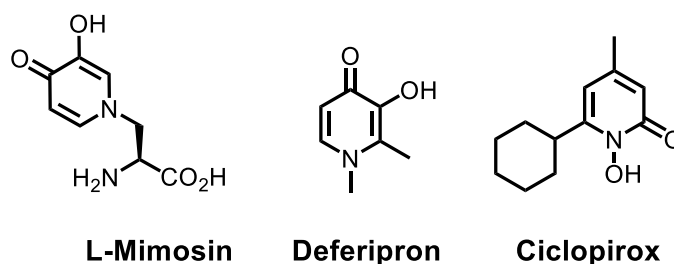


Abbildung 1-8: Strukturen der Pyridone Mimosin, Deferipron und Ciclopirox. Eine Reduktion der ribosomalen Beladung der mRNA von HIV-1 und die herunterregulierte Proteinbiosynthese des p24-Proteins konnten durch Inhibition der eif5a-Hydroxylierung durch die gezeigten Pyridone identifiziert werden.

1.1.4 Die Struktur von eif5a als medizinisches Target

Eif5a wurde erstmals aus roten Blutzellen aufgereinigt und identifiziert.^[72] Humanes eif5a existiert in zwei Isoformen, wobei Diese 84% Übereinstimmung in ihre Aminosäure-Sequenz haben.^[18,73–75] Das eif5a1 Gen ist ubiquitär exprimiert, wobei eif5a2 im Gehirn und in den Hoden nachgewiesen werden konnte.^[74] Eine Überexpression beider Proteine konnte in verschiedenen Ovarial-Karzinomen aufgezeigt werden.^[74,76,77] Die Aminosäure-Sequenz in der Nähe der Hypusierungsstelle Lys⁵⁰ ist nicht nur in beiden Isoformen konserviert, sondern zeigt auch in allen eukaryotischen Lebensformen sehr große Übereinstimmung.^[18] Abbildung 1-9 zeigt die monomere Einheit des eif5a-Proteins aus *Arabidopsis thaliana*.^[78]

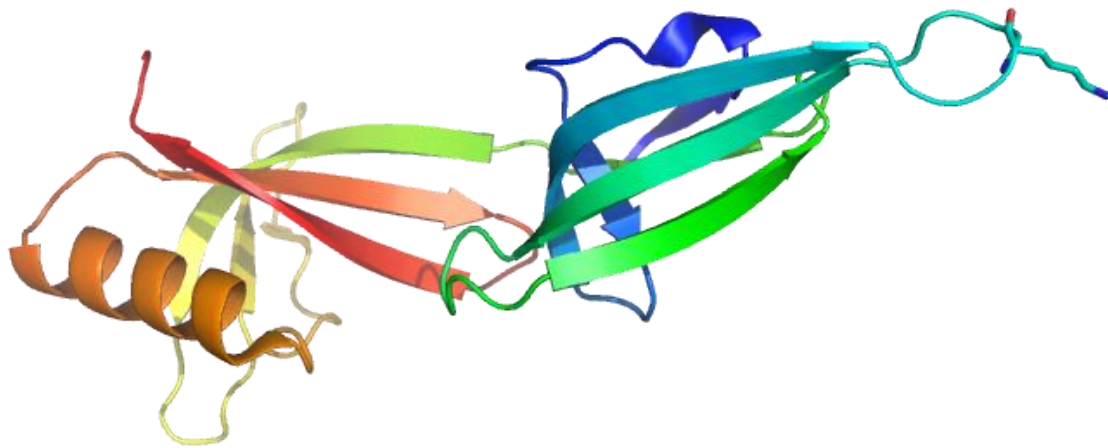


Abbildung 1-9: Monomere Struktureinheit des eif5a-Proteins aus *Arabidopsis thaliana* (pdb: 3hks). Die Seitenkette des relevanten Lys⁵⁰ ist hier ausgezeichnet.^[78]

Die *N*-terminale Domäne des eif5a Proteins wird von β -Faltblättern dominiert, das Motiv dieser Domäne ähnelt dabei sehr stark einer *SH3-barrel*-Struktur, die sich aus den Faltblättern β_1 bis β_6 und einer 3_{10} -Helix zusammensetzt.^[79] Die Faltblätter β_3 bis β_6 bilden ein verdrehtes, halboffenes β -barrel. Die Hypusierungsposition Lys⁵⁰ befindet sich dabei im *turn*-Bereich zwischen den antiparallelen Faltblättern β_3 und β_4 . Bei genauerer Betrachtung dieser *turn*-Struktur wird deutlich, dass es sich hierbei um keinen klassischen, antiparallelen β -hairpin handeln kann (Abbildung 1-10).

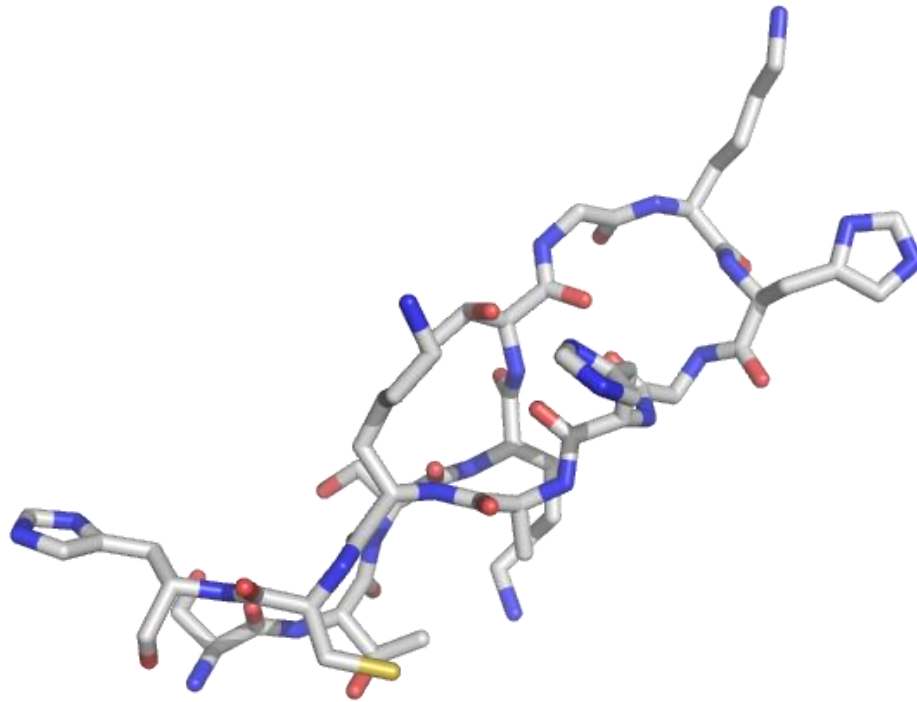


Abbildung 1-10: β -hairpin Struktur (Ser⁴⁴-His⁵⁷) des eif5a-Proteins, welche die Lys⁵⁰-Position in $i+1$ umfasst. Die Seitenkette dieses Lysins wird in Hypusin überführt. Genauere strukturelle Analyse dieses *hairpin*-Musters, lässt keine Zuordnung zu den klassischen β -hairpin Typen zu (pdb: 3hks).^[78]

Es kann kein klassisches Muster der potentiellen Wasserstoffbrücken-Netzwerke identifiziert werden. Viel mehr kann die Struktur dieses *hairpins* einem sogenannten *A4-residue hairpin* zugeordnet werden. Im *A4-residue hairpin* nehmen die ersten beiden Aminosäuren eine Konformation einer rechtsgängigen α -Helix ein, die Konformation der dritten Aminosäure liegt zwischen rechtsgängig α - und β -helikal während die letzte Aminosäure die Konformation einer linksgängigen α -Helix aufweist. Dieses Strukturelement wird im Vergleich mit den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten β -hairpin Epitope zu einem späteren Zeitpunkt ausführlich diskutiert.

Während bereits Tri- und Tetrapeptide als durchaus potente Inhibitoren der Hydroxylase beschrieben werden konnten^[16], wurde die Sekundärstruktur rund um die Position der posttranslationalen Modifikation an Lys⁵⁰ noch nicht als medizinisches Target in Betracht gezogen. In einer japanischen Arbeit aus dem Jahre 2015 konnte gezeigt werden, dass bei Freisetzung des strikt intrazellulären eif5a-Proteins in den extrazellulären Raum, dieses Protein als parakriner Verstärker des Apoptose-Signals dient. Dabei zeigt dieser Effekt keine signifikante Abhängigkeit vom Grad der posttranslationalen Modifikationen.^[80] Ziel dieser

Arbeit ist daher die Synthese und das Design von β -*hairpin* Strukturen dieses Proteins, welche die native Sekundärstruktur einnehmen und demnach Proteinfunktionen, wie beispielsweise die erwähnte parakrine Verstärkung von Apoptose nachahmen könnten.

1.2. β -*hairpin* Peptide – Design und Strukturaufklärung

1.2.1. β -turns

β -turns dienen oft als Erkennungsmerkmal für Antikörper oder Rezeptoren. Ihr Strukturmotiv ist daher oft an der Oberfläche von Proteinen zu finden, was posttranslationale Modifikationen ermöglicht.^[81–83] Der *turn*-Bereich besteht aus vier Aminosäure-Resten, deren Position als i bis $i+3$ bezeichnet werden, wobei der Abstand zwischen dem ersten und dem letzten α -Kohlenstoff nicht mehr als 7 Å betragen darf.^[84,85] In Abhängigkeit der Torsionswinkel der beteiligten Aminosäuren kann die Geometrie eines β -turns eindeutig charakterisiert werden.^[84] Diese Charakterisierung wird im Diskussionsteil dieser Arbeit zur Beschreibung der synthetisierten Peptide ausführlich diskutiert, weshalb an dieser Stelle darauf verwiesen sein soll.

1.2.2 NMR-Spektroskopie

Als einzige Messmethode erlaubt die NMR-Spektroskopie die Strukturbeschreibung von Peptiden und Proteinen in Lösung unter Variation verschiedenster Parameter, wie beispielsweise Lösungsmittel, Temperatur oder Konzentration. Dynamische Prozesse, deren Zeitskala kleiner ist als die der NMR-spektroskopischen Messung, können somit aufgelöst werden. Nachfolgend werden die im Rahmen dieser Arbeit angewandten Messmethoden kurz beschrieben.

1.2.2.1 Correlation spectroscopy (COSY)

Die *correlation spectroscopy* (COSY) ist eine zweidimensionale Messmethode, welche die skalaren, vicinalen und geminalen Kopplungen homonuklearer Spins darstellt. Beide Frequenzdomänen enthalten identische Information, sodass ein COSY-Spektrum symmetrisch zur Diagonale ist. Als Messtechnik hat sich dabei ein Doppelquanten-gefiltertes COSY etabliert. Bei dieser Messung befinden sich sowohl Kreuz- als auch Diagonalsignale in Antiphase in beiden Dimensionen, sodass im Gegensatz zum gewöhnlichen COSY-Experiment starke Diagonalsignale in Phase vermieden werden.

1.2.2.2 Total correlated spectroscopy (TOCSY)

Im Gegensatz zum COSY-Spektrum werden in einem TOCSY-Spektrum skalare Kopplungen in Abhängigkeit der *spin-lock*-Zeit, sowie der Größe der homonuklearen Kopplungen eines gesamten Spinsystems korreliert. Besonders für Peptide und Proteine eignet sich diese Methode, da Aminosäure-Reste sehr einfach anhand deren charakteristischer gesamter Spinsysteme differenziert werden können.

1.2.2.3 Heteronuclear single/multiple quantum coherence (HSQC bzw. HMQC)

In einem $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum wird die skalare 1J -Kopplung der heteronuklearen Spins dargestellt. Kreuzsignale entsprechen dabei der direkten Konnetivität des Protons zum jeweiligen Kohlenstoff und umgekehrt. Zur Auswertung eines HSQC-Spektrums ist neben dem klassischen ^1H -NMR-Spektrum noch ein breitbandenkoppeltes ^{13}C -Spektrum notwendig. Dabei kann die Korrelation auch zu weiteren Heterokernen, wie beispielsweise ^{15}N , ^{19}F oder ^{31}P erfolgen. Durch die inverse Messtechnik wird ein 32-facher Intensitätsgewinn (^1H - ^{13}C -HSQC) erhalten.

1.2.2.4 Nuclear overhauser enhancement spectroscopy (NOESY bzw. ROESY)

NOESY- bzw. ROESY-Spektren unterscheiden sich dadurch von den zuvor dargestellten Messmethoden, dass hierbei keine skalare, sondern eine dipolare Kopplung zwischen zwei nicht zwangsweise homonuklearen Spins gemessen wird. Der Magnetisierungstransfer ist dabei unabhängig von der Konnektivität der beteiligten Kerne, sondern wird durch deren räumlichen Abstand bestimmt.

Die Abhängigkeit für die Signalintensität I entspricht dabei $I \sim d^{-6}$, sodass ein Mindestabstand d von ca. 4.5 \AA für die Detektion eines Signals notwendig ist. Die Signale des NOESY-Spektrums sind dabei von der molekularen Beweglichkeit abhängig, sodass in Abhängigkeit der Molekülgröße bzw. des Molekulargewichts eine Änderung des Vorzeichens der Signalintensität erfolgt. Bei ca. 500 g/mol entspricht die *molecular tumbling rate* der Spektrometerfrequenz, was zur Folge hat, dass keine oder nur noch sehr schwache dipolare Kopplungen gemessen werden können. Dieses Problem kann mit der sogenannten *rotating frame NOE-spectroscopy* (ROESY) umgangen werden, da bei dieser Messtechnik auf den 90° -Puls und der darauffolgenden *Entwicklungszeit* eine *spin-lock-Periode* folgt, während

beim NOESY die Abfolge 90° -Puls, *Entwicklungszeit*, 90° -Puls, *Mischzeit*, 90° -Puls bevor der FID aufgezeichnet wird. Während NOE-Signale ausnahmslos ein positives Vorzeichen besitzen, zeigen ROE-Signale ein negatives Vorzeichen.^[86–88]

1.2.2.5 NMR-Spektroskopie unter physiologischen Bedingungen

Zur Charakterisierung von Proteinen und Peptiden in physiologischer, wässriger Umgebung mittels NMR-Spektroskopie kann kein D₂O als Lösungsmittel verwendet werden, da die vergleichsweise hohe Acidität für Amid- und Alkoholprotonen deren chemischen Austausch beschleunigt, sodass deren Signale nicht detektiert werden können, die unter Umständen wichtige strukturelle Informationen liefern würden. In einem standardmäßig aufgezeichneten Protonenspektrum ist zudem die Resonanz des Wassersignals so intensiv, dass keine weiteren Signale mehr sichtbar sind. Aus diesen beiden Gründen ist für die Messung im wässrigen System eine Unterdrückung des Wassersignals notwendig. Hierzu sind zwei Methoden etabliert. Die erste Möglichkeit besteht in der Vorsättigung des Resonanzsignals des Wassers, wobei vor dem eigentlichen Anregungspuls ein auf die Frequenz des Wassers angepasste Radiofrequenzpuls eingestrahlt wird, sodass bei der Anregung die Wassermoleküle noch nicht relaxiert sind. Hierdurch wird die Intensität des Wassersignals im aufgezeichneten Spektrum stark verringert, jedoch betrifft dies auch Signale, die eine ähnliche chemische Verschiebung aufweisen, sich also in der Nähe des Wassersignals befinden. Bei der zweiten Methode zur Unterdrückung des Wassersignals kommen gepulste Feldgradienten zum Einsatz. In Richtung der *z*-Achse wird dabei eine gepulste Gradientensequenz eingestrahlt, was in einer Phasenverschiebung resultiert. Durch erneutes Einstrahlen der identischen Frequenz kann wieder Phasengleichheit gegeben werden. Bei der *WATERGATE* (*water suppression by gradient-tailored excitation*)-Pulssequenz werden durch einen Feldgradienten G_1 alle Spins phasenverschoben. Nach einer 90°_{-y} , 180°_y , 90°_{-y} -Pulsabfolge wird erneut der Feldgradient eingestrahlt, sodass alle Protonen angeregt werden, die nicht dem durch den Feldgradienten generierten *Offset* übereinstimmen. Entspricht dieser Offset der Resonanzfrequenz des Wassers, so kommt es zur Unterdrückung des Wassersignals (Abbildung 1-11).

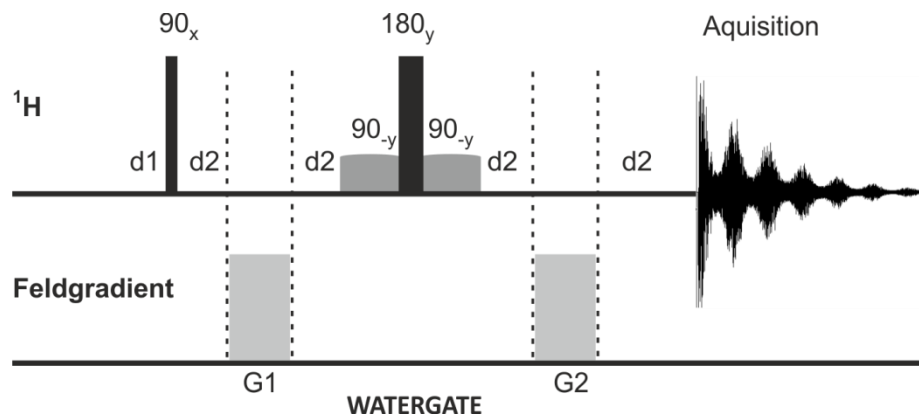


Abbildung 1-11: Pulssequenz des WATERGATE-Experiments: Durch die Erweiterung eines Standard-Protonenexperiments mit zwei auf die Resonanzfrequenz des Wassers abgestimmte 90° -Puls wird die Wasserfrequenz nicht invertiert. Der Gradientenpuls G2 wirkt weiter defokussierend und alle übrigen Resonanzen werden refokussiert.

1.2.2.6 Cochrans hydrophober Cluster – Mehr als nur ein Modellpeptid?

Die Faltung eines β -hairpins basiert auf der Wechselwirkung der Aminosäure-Seitenketten, wobei diese Wechselwirkungen in elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen unterschieden werden können.^[89] Weiterhin können diese Wechselwirkungen in lokale, als auch *long-range* Wechselwirkungen unterschieden werden. Eine in der Fachliteratur häufig beschriebene Klasse von synthetischen Peptiden, die nachweislich in Lösung eine β -hairpin-Struktur aufzeigen, sind die von Cochran *et al.* beschriebenen *trpzip*-Peptide.^[90] Diese Peptide aus insgesamt zwölf Aminosäuren beinhalten vier Trp-Einheiten, die jeweils durch einen Thr-Rest voneinander getrennt sind. Neben den klassischen, aromatischen Wechselwirkungen gegenüberliegender Aminosäure-Seitenketten, addiert sich durch die gewählte Anordnung der Trp-Positionen eine diagonale Wechselwirkung auf der gleichen Seite des hairpins zur Stabilisierung dazu. Abhängig von den Aminosäuren in den Positionen $i+1$ und $i+2$ kann dieses Templat zur Darstellung von $\beta\text{I}'$ - (Gly-Asn, pro-Asn) oder $\beta\text{II}'$ -turn-Strukturen (Asn-Gly) genutzt werden. Eine weitere Möglichkeit zur Stabilisierung von β -hairpin-Strukturen ist die kovalente Verknüpfung der beiden Stränge. Synthetisch kann dabei auf eine ganze Bibliothek an Zyklisierungsmethoden zurückgegriffen werden, die von Click-Chemistry^[91] und Makrolactamisierung^[92] über Metallkomplexierung^[93], Oxadiazol-Formation^[94] und Makrolactonisierung^[95] bis hin zur Grubbs-Metathese reicht.^[96,97] Die Natur nutzt hierzu am Häufigsten Disulfidbrücken. Strukturen für Disulfid-reiche Peptide sind beispielsweise Defensine^[98,99], Cyclotide^[100,101], Conotoxine^[102,103] und Lanthipeptide.^[104] Im

Jahre 2003 veröffentlichten *Cochran et al.* durch systematische Mutation des *bhpW*-Peptids^[105] die Struktur des *bhpHV*-Peptids^[106]. In beiden Strukturen wurden die β -*hairpin*-Stränge mittels Ausbildung eines intramolekularen Disulfids kovalent miteinander verknüpft. Die Wechselwirkungen der Aminosäure-Reste untereinander wurden dabei systematisch so optimiert, dass ein möglichst stabiler *hairpin* in Lösung entstand (Abbildung 1-12). Zur Ausbildung eines β -*hairpins* mit antiparallelen Faltblättern muss die Anzahl der an der Ausbildung der Struktur beteiligten Aminosäuren der $4n+2$ -Regel entsprechen.^[107] Dies wird durch die Tatsache definiert, dass sich jeweils an den beiden Enden der Stränge ein gemeinsames Paar von Wasserstoffbrücken-gebundenen Amidprotonen befinden muss. Das Konzept des hydrophoben Clusters nach *Cochran et al.* kann also nur auf Peptide mit 6 ($n=1$), 10 ($n=2$), 14 ($n=3$), 18 ($n=4$) usw. Aminosäuren angewendet werden.^[4,90,106]

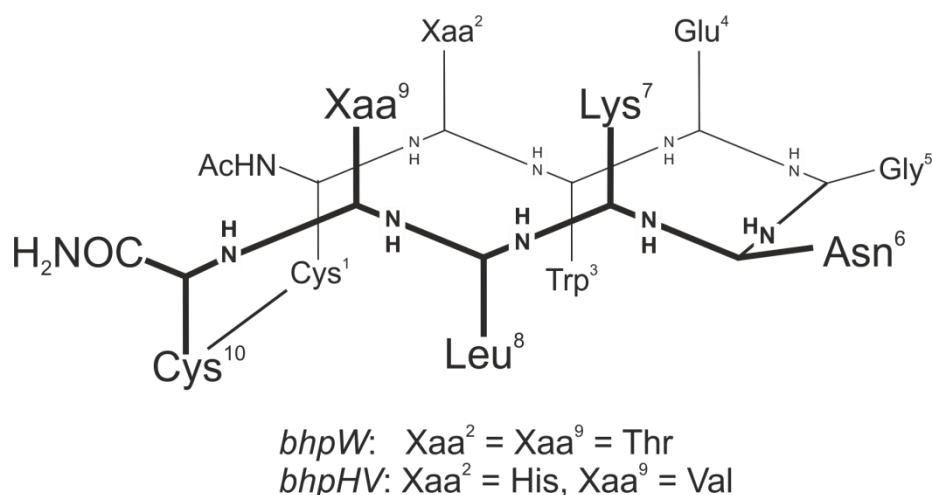


Abbildung 1-12: β -*hairpin* Strukturen der zyklischen *bhpW* und *bhpHV* Decapeptide: Durch systematische Mutation konnte die gezeigten Sequenzen erhalten werden, die stabile β -*hairpin*-Strukturen darstellen.

In vorangegangenen Arbeiten in der Arbeitsgruppe *Geyer* konnte das Netzwerk C¹HWE⁴-K⁷LVC¹⁰ dazu genutzt werden, das Bindungsepitop von anti-citrullinierten Peptid-Antikörpern zu präsentieren, ohne das dabei dessen Antikörper-Affinität negativ zu beeinflussen.^[108,109] In einer weiteren Arbeit konnten durch Kombination des hydrophoben Clusters mit D-konfigurierten Aminosäuren Peptide entwickelt werden, die in der Lage sind Subgruppen polyklonaler Antikörper zu unterscheiden, was die Diskriminierung humaner rheumatoider Arthritis Auto-Antikörper in einem *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) Essay ermöglicht.^[110] Weiterhin bildete der Cluster die Basis zur Synthese eines Cystein-reichen β -*hairpins*, welcher spontan in ein antiparalleles, doppeltes *hairpin*-Motiv dimerisierte.^[111]

1.3 Durchflusszytometrie

1.3.1 Allgemeine Einführung

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. In den letzten Jahren hat sich zudem der Name *fluorescence activated cell sorting* (FACS) etabliert, wobei dies ein Markenname der Firma *Becton Dickinson* darstellt. Grundlage dieses Messprinzips ist eine (meist fluoreszenzmarkierte) Einzelzellsuspension, die einen fokussierten Laserstrahl passiert. Dabei wird das auftretende Fluoreszenz- und Streulicht gemessen, was eine quantitative Aussage über Struktur und Verhalten verschiedener Zellen ermöglicht. Es kann eine große Bandbreite an Zellen, von Bakterien (ca. 0.5 μm Durchmesser) bis hin zu Monozyten (ca. 15 μm Durchmesser) angewandt werden. Ein Messaufbau ist in Abbildung 1-13 schematisch dargestellt.

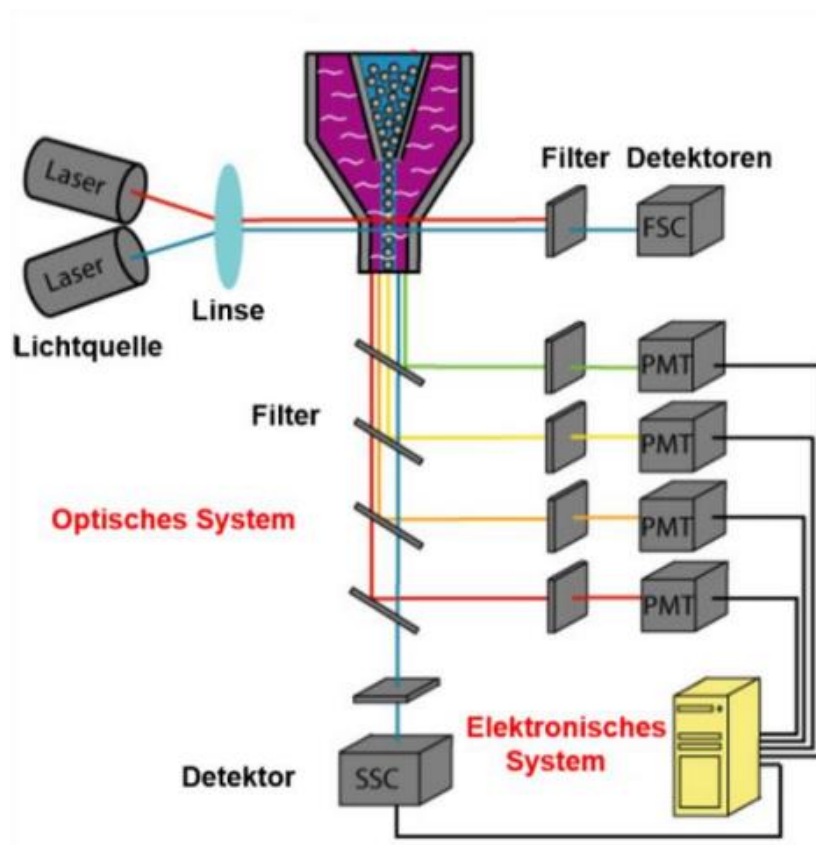


Abbildung 1-13: Messaufbau eines Durchfluss-Zytometers: Ein monochromatischer Laser trifft auf eine hydrodynamisch fokussierte Zellsuspension. Das daraus resultierende Streulicht wird in Richtung des Laserstrahls (FSC) und im 90° Winkel dazu detektiert (SSC). Die Analyse des Streulichts liefert Informationen zur Struktur der Zelle. Das seitliche Streulicht durchläuft zudem mehrere Fluoreszenz-Filter, sodass auch Signale

von fluoreszenz-markierten Zellen oder Antikörpern aufgezeichnet werden können. PMT: *Photomultiplier Tubes*.^[112]

Ein monochromatischer Laserstrahl trifft dabei auf einen kontinuierlichen Fluss einer Zellsuspension, welcher hydrodynamisch fokussiert wird, sodass der Laserstrahl immer nur eine einzelne Zelle trifft. Beim Auftreffen der Strahlung auf die Zelloberfläche, erfährt das Licht Reflexion und Streuung in alle Richtungen. Als *Forward Scatter* (FSC) wird dabei das Streulicht in Richtung des Laserstrahls bezeichnet. Mittels eines Filters, einem sogenannten *obscurator bar*, wird das vorwärts gestreute Licht vom einfallenden Laserlicht separiert. Durch einen Dioden-Array-Detektor erfolgt dann die Aufzeichnung des Streulichts. Die durch das Streulicht aufgezeichnete Detektor-Spannung ist dabei grob proportional zur Größe der Zelle, an welcher das Laserlicht zuvor gestreut wurde. Große Zellen, wie beispielsweise Monozyten erzeugen demnach einen größeren FSC als Bakterien. Die Zahl der Zellen mit einem entsprechenden FSC-Muster kann quantifiziert werden und wird als *cell count* (CC) bezeichnet. Durch Auftragung des CC gegen den FSC wird ein Histogramm gemäß Abbildung 1-14 erhalten.^[113–115]

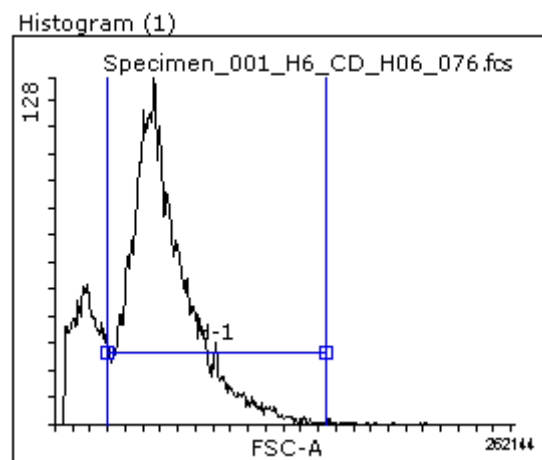


Abbildung 1-14: Auftragung des CC in 10^4 Einheiten gegen den FSC für TNF-stimulierte Jurkat 2D10 HIV-Zellen.

Neben dem FSC erzeugt das Auftreffen der Laserstrahlung auf die Zelloberfläche auch Streulicht in seitlicher Richtung. Dazu befindet sich ein Detektor in 90° Position bezüglich des einfallenden Laserstrahls. Dieses Streulicht wird als *side scatter* (SSC) bezeichnet. Der SSC ist dabei abhängig von der Granularität der Zelle, sowie der Größe und Struktur ihres Zellkerns. Auch hierbei kann dann ein zu Abbildung 1-14 analoges Histogramm generiert werden, indem der CC gegen den entsprechenden SSC aufgetragen wird. Dies ist in Abbildung 1-14 gezeigt.^[113,116,117]

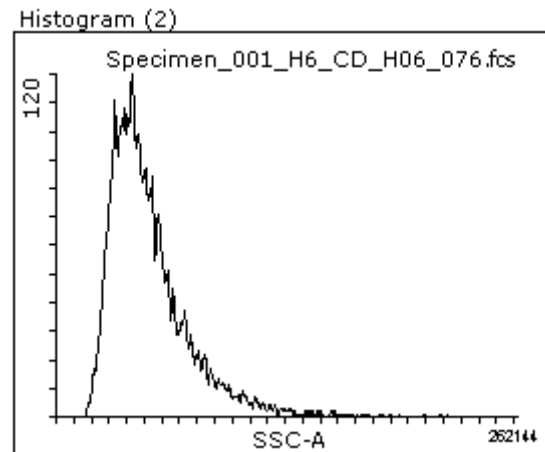


Abbildung 1-15: Auftragung des CC in 10^4 Einheiten gegen den SSC für Jurkat 2D10 HIV-Zellen.

Bevor das seitwärts gestreute Licht auf den dazugehörigen Detektor trifft, durchläuft es mehrere Fluoreszenz-Filter. Dies ermöglicht, bei Anwendung einer Zellkomposition, die vorherige Anfärbung bestimmter Zelltypen mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper. Der konjugierte Fluorophor muss dabei von der Wellenlänge des einfallenden Laserstrahls anregbar sein. Die vom Fluorophor emittierte, langwelligere Strahlung wird analog seitwärts gestreut, sodass durch die Anwendung eines entsprechenden Wellenlänge-Filters diese Strahlung in einem separierten Detektionssystem aufgezeichnet werden kann. Moderne Durchfluss-Zytometer können dabei auf bis zu 16 Kanälen gleichzeitig aufzeichnen. Entsprechend kann die Fluoreszenz-Intensität des Fluorophors analog gegen SSC oder FSC in einem Histogramm aufgetragen werden (Abbildung 1-15), sodass beispielsweise Zellen mit ähnlichem FSC, also ähnlicher Größe aber unterschiedlichem Bindungsverhalten bezüglich des Antikörpers voneinander getrennt quantifiziert werden können. Die Anwendung multipler Antikörper mit unterschiedlichen Fluorophoren erlaubt die Auftragung von Fluoreszenz-Intensitäten, so dass sich kreuzende Bindungsmuster untersucht werden können. Auch die Anfärbung von freigesetzter DNA-Fragmente mittels Propidiumiodid (PI) oder apoptotischer Zellen mittels Annexin-V ist möglich.^[118–120]

Erst die Kombination beider Informationen, also des FSC und des SSC, liefern die gewünschten komplexen Informationen, daher wird oft die Auftragung des FSC gegen den SSC oder umgekehrt gewählt. Diese Auftragung wird als *DotPlot* gezeichnet und ist in Abbildung 1-16 gezeigt.

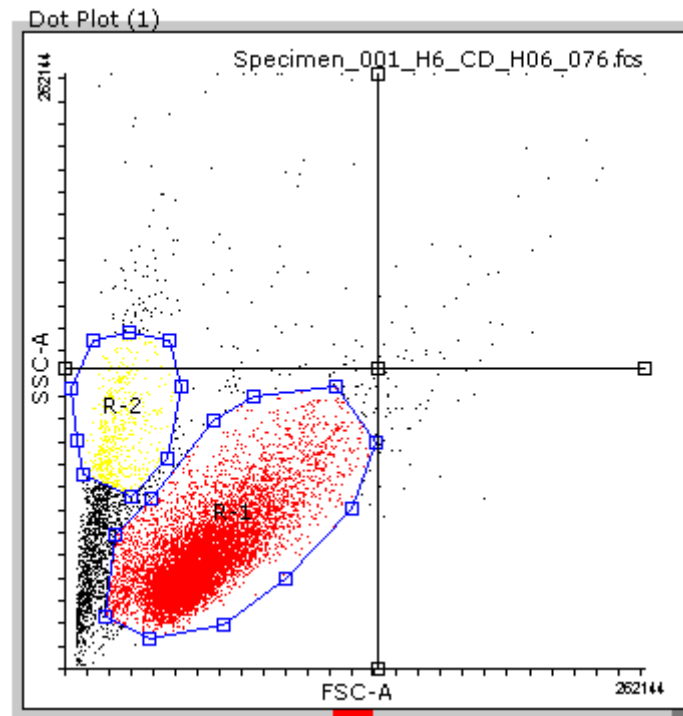


Abbildung 1-16: *DotPlot*-Auftragung für unstimulierte Jurkat 2D10 HIV-Zellen.

Im *DotPlot* können die Zellen simultan gemäß ihrem SSC und FSC unterschieden werden. Durch die Definition bestimmter Region und Quadranten, können diese anschließend quantifiziert und analysiert werden. Abbildung 1-17 zeigt das BD LSR-Fortessa Durchflusszytometer am *Institute for Molecular Biology and Microbiology* an der *Case Western Reserve University* in Cleveland, Ohio, USA.



Abbildung 1-17: Fotografische Aufnahme des Durchflusszytometers an der *Case Western Reserve University* in Cleveland, Ohio, USA.

1.3.2 Durchflusszytometrie im Jurkat E6/2D10 System

Bei den beiden Jurkat Zellen handelt es sich um immortalisierte T-Zell Lymphozyten^[121–123], die 1977 von der Arbeitsgruppe um *Schneider* an der *Kinderklinik der Universität Erlangen-Nürnberg* etabliert wurden.^[121] Die Zellen stammten aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen, der an akuter lymphatischer Leukämie erkrankt war. Jurkat-Zellen wachsen adhären. Heute kann auf eine ganze Bandbreite von Jurkat-Varianten zurückgegriffen werden.^[124] Sie werden dazu verwendet T-Zellen-Leukämie, T-Zellen Signalwege und die Expression chemokiner Rezeptoranfälligkeiten bei Virusinfektionen zu untersuchen.^[125] Jurkat-Zellen sind dabei sehr hilfreich, da sie in der Lage sind den T-Zell-Wachstumsfaktor Interleukin 2 zu produzieren, welcher entscheidene Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus bei der Erforschung neuer viraler- und Krebsmedikamente liefert.^[123,126–129]

Bei der Jurkat 2D10-HIV Zelllinie handelt es sich ebenfalls um T-Zell-Lymphozyten, welcher in der Lage sind eine nicht-infektiöse Form des HI-Virus zu exprimieren. Diese Expression kann durch die Behandlung mit Tumor-Nekrosefaktor α (TNF- α) induziert werden. Kommt es zur Expression des Virus, wird gleichzeitig GFP an der Zelloberfläche freigesetzt, welches als Messsensor in der Durchflusszytometrie genutzt werden kann. Die Jurkat E6-Zelllinie stellt ein Analogon der 2D10-Zelllinie dar, wobei E6-Zellen kein Virus und damit auch kein GFP exprimieren können. Sie dient also als Kontroll-Zelllinie bezüglich apoptotischer Effekte und Zytotoxizität.^[124,130–134]

2. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung synthetischer β -hairpin Peptide, welche die Epitopsequenz des eif5a-Proteins in eben dieser Sekundärstruktur fixieren. Diese Region der Aminosäuresequenz GXHG (mit X= K bzw. Dhu, Hyp) wird ausschließlich in diesem Protein gefunden (Abbildung 2-1).

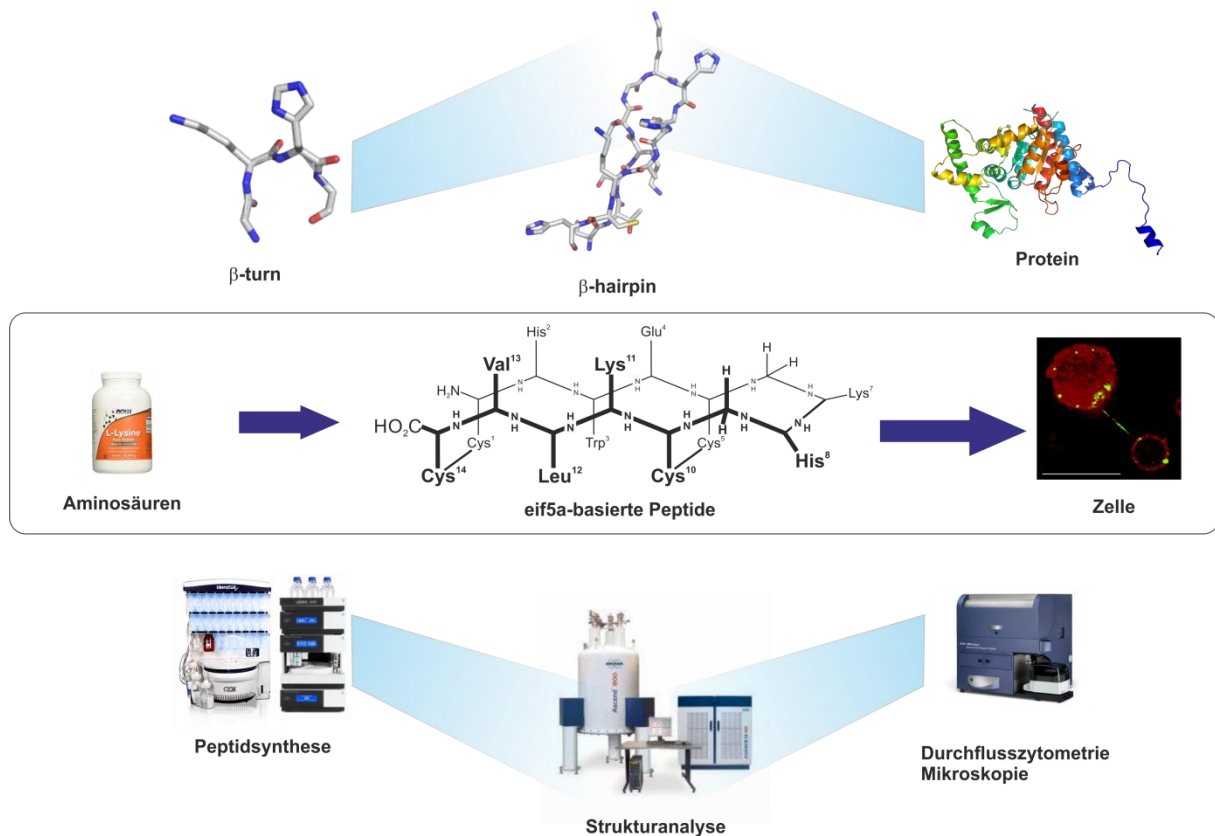


Abbildung 2-1: Strukturelle Analyse vorliegender Kristallstrukturen des eif5a-Proteins zeigen, dass sich die biologisch relevante Epitop-Sequenz in einer β -turn Struktur befinden (oben). Die Darstellung des entsprechenden Peptidfragments mittels automatisierter Peptidsynthese führt laut NMR-Analyse zu keiner Ausbildung einer Sekundärstruktur und zu keinem relevanten biologischen Signal in der Durchflusszytometrie (unten). Ziel dieser Arbeit war es daher, durch Strukturdesign formstabile β -turn-Strukturen, welche das eif5a-Epitop enthalten. Diese Verbindungen sollten anschließend mittels Durchflusszytometrie und Mikroskopie in biologischen Umgebungen getestet werden, so dass Struktur-Aktivitäts-Beziehungen hergestellt werden können (mittig).

Um diese Sequenz nun in einer Konformation in Lösung zu fixieren, sollte die Epitop-Sequenz mit dem hydrophoben Cluster kombiniert werden. Hierzu sollte untersucht werden, wie groß der Anteil der Cluster-Aminosäuren minimal sein muss, um die Ausbildung der Sekundärstruktur gewährleisten zu können (Abbildung 2-2 beige). Hierzu muss die

regioselektive Oxidation von Cystein-reichen Peptiden optimiert werden (Abbildung 2-2 lila) Strukturelle Charakterisierung der Peptide sollte mittels 2D NMR-Spektroskopie erfolgen, wobei besonderes Augenmerk auf Messparameter gelegt werden sollten, mit welchen sich die Faltung der Peptide quantifizieren lassen. Auch die Größe der erhaltenen Peptide sollte im Kontext der $4n+2$ -Regel untersucht werden. Da hinter dem in der Epitop-Sequenz auftauchenden doppelten Glycin-Motiv in den Positionen i und $i+3$ eine besondere strukturelle Relevanz vermutet wird, sollten punktuelle bzw. paarweise Ala bzw. ala-Mutationen dieser Positionen einen Einblick in die Dynamik des Systems geben (Abbildung 2-2 orange).

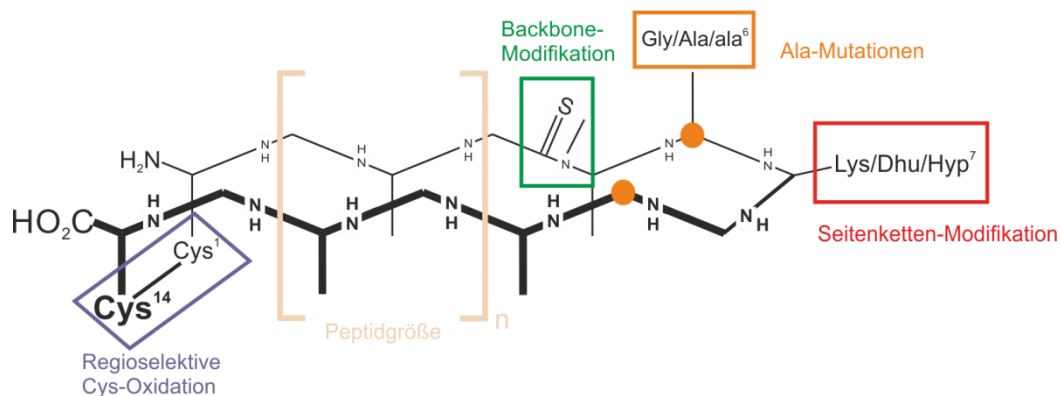


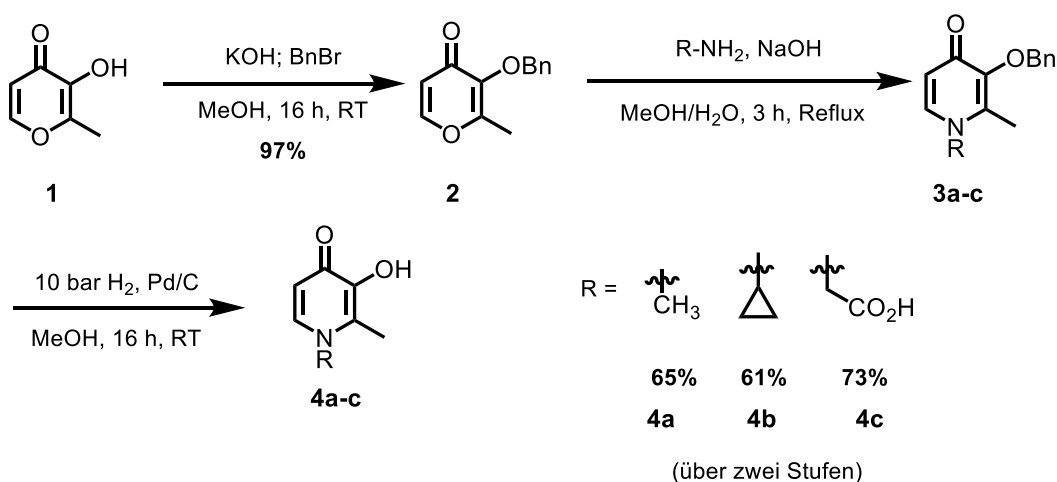
Abbildung 2-2: Modulare Peptidmodifikation, welche im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurden: Backbone-Modifikationen (grün), wie die Einführung von Thioamiden bzw. *N*-Methyl-Amiden erlaubt die unmittelbare Veränderung des Wasserstoffbrücken-Netzwerkes im *hairpin*. Ala-Mutationen (orange) tragen zur strukturellen Charakterisierung des Doppel-Glyc-Motivs bei. Seitenketten-Modifikation (rot) können Informationen liefern, inwiefern biologische Prozesse vom Grad der posttranslationalen Modifikationen abhängig. Zusätzlich können Peptide durch metallbindende Aminosäuren oligomerisiert werden. Weitergehend kann die Größe der Peptide (beige) im Rahmen der $4n+2$ -Regel variiert werden, was durch das Einbringen zusätzlicher Cys-Einheiten eine regioselektive Cys-Oxidation erfordert (lila).

Der synthetische Zugang zu *N*-methylierten Fmoc-Aminosäuren bzw. Fmoc-Thioaminosäuren-Aktivestern bietet weitergehend die Möglichkeit regioselektiv das *hairpin*-typische Muster von Wasserstoffbrücken-Bindungen zu modifizieren (Abbildung 2-2 grün). Da das Enzym der Hydroxylase durch Metallchelatoren wie Deferipron inhibiert werden kann, sollten weitergehend metallkomplexierende Aminosäuren entwickelt werden, die dann nicht nur zur Inhibition des Enzyms, sondern weiterführend zur Oligomerisierung der Peptide genutzt werden sollten. Die weitergehende Synthese von entsprechend geschützten Desoxyhypusins bzw. Hypusins-Bausteinen für die Peptidsynthese sollte Aufschluss darüber geben, inwiefern die biologischen Effekte eine Hydroxylierungsabhängigkeit aufweisen (Abbildung 2-2 rot).

Auf Basis der Strukturanalyse sollten die designten Peptide in der konfokalen Mikroskopie und der Durchflusszytometrie in biologischen Systemen auf ihre Wirkung als parakriner Apoptose-Verstärker getestet werden, sodass Struktur-Aktivitäts-Beziehungen hergestellt werden können.

3 Synthese neuer Deferipron-Derivate

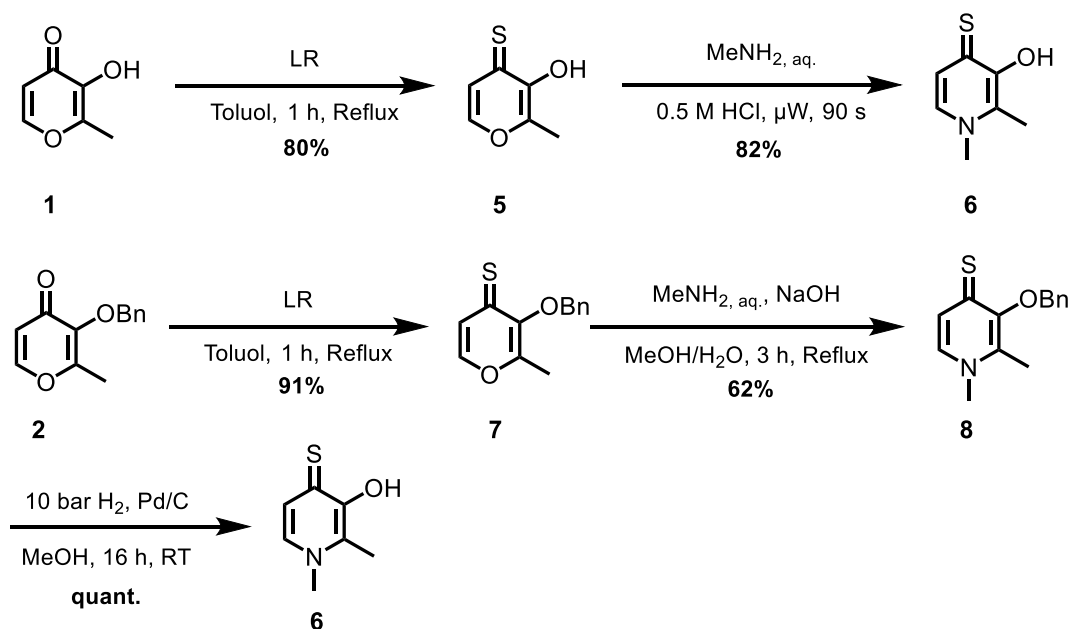
Die antiretrovirale Aktivität von Deferipron **4a** legt den Ansatz nahe, weitere Strukturanaloga dieses Pyridons zu synthetisieren und ihre biologische Aktivität im Jurkat-Zellsystem zu untersuchen.^[68,69] Hierzu wurden einige Strukturanaloga synthetisiert bei welchen hauptsächlich die Stickstoff-Substitution variiert wurde. Zwei retrosynthetische Ansätze sind dabei denkbar: Zum einen die direkte Aminolyse des Maltols **1** mit dem entsprechenden, primären Amin und zum anderen die formal längere Route über eine temporäre Benzyl-Schützung des Phenols **2** mit drauffolgender Aminolyse zu **3a-c** und hydrogenolytischer Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe zu **4a-c**.^[135,136] Beide Routen wurden untersucht, wobei die direkte Aminolyse des Maltols deutliche geringere Ausbeuten über den kürzeren Syntheseweg lieferte. Diese Beobachtung ist bereits in der Fachliteratur beschrieben.^[137] Schema 3-1 zeigt die Synthese der γ -Pyridone mit Variation der *N*-Substitution.



Schema 3-1: Synthese der modifizierten Deferipron-Derivate: Benzyl-Schützung von Maltol **1** liefert das γ -Pyranon **2**, welches anschließend mit dem entsprechend primären Amin umgesetzt wird. Hydrogenolytische Abspaltung lieferte schließlich die Derivate **4a-c**. Mit 1-Adamantylamin, 2-Adamantylamin und *t*-Butylamin konnte in der Aminolyse kein Umsatz beobachtet werden.

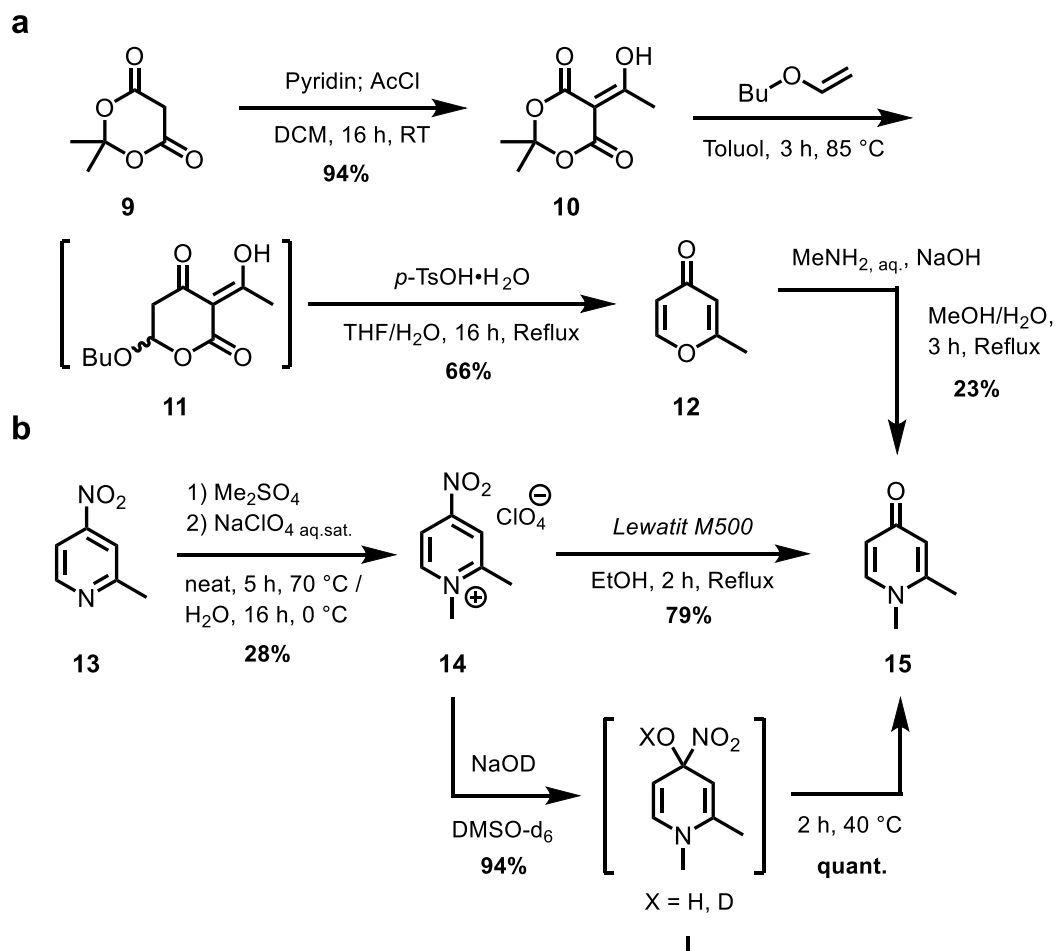
Ausgehend von Maltol **1** wurde dies zunächst durch nukleophile Substitution Benzylgeschützt, bevor die Aminolyse mit dem respektiven Amin (Methylamin_{aq.}, Cyclopropylamin und Glycin) durchgeführt wurde. Abschließende hydrogenolytische Abspaltung der Schutzgruppe lieferte die modifizierten Deferipron-Derivate **4a-c**.^[138–141]

Ein weiterer interessanter Ansatz dabei ist, die Keto-Funktion zum Thion zu überführen, da in bereits durchgeführten Studien am aufgereinigten Enzym der Hydroxylase mit Thio-Deferipron im Vergleich zu Deferipron keinerlei Aktivität gemessen werden konnte (Dr. Hanauske-Abel, Dr. Wolff, Dr. Park – bisher unveröffentlichte Ergebnisse). Synthetisch waren erneut die beiden Routen zum Thio-Derivat **6** denkbar, wobei bei der Variante mit temporärer Benzyl-Schätzung das Derivat **6** nur sehr mäßig vom Pd/C-Katalysator abgetrennt werden konnte. Mittels NMR-Spektroskopie konnte jedoch ein vollständiger Umsatz nachgewiesen werden. Hier wurde die direkte Aminolyse des Thiomaltols **5** durchgeführt, welches zuvor mittels *Lawessons Reagenz* aus Maltol **1** gewonnen werden konnte.^[142–144] Die direkte Aminolyse erfolgte unter Mikrowellen-Bedingungen und es konnte bereits nach 90 Sekunden ein vollständiger Umsatz erhalten werden. Diese Beobachtung, dass bei der Aminolyse von γ -Thiopyranon der Einsatz von Mikrowellenstrahlung den Umsatz steigert, ist bereits in der Fachliteratur bekannt.^[144,145] Die Syntheseroute ist in Schema 3-2 gezeigt.



Schema 3-2: Synthese von Thio-Deferipron **6**: Die direkte Umsetzung von Maltol **1** mit *Lawessons Reagenz* (LR) und anschließender, mikrowellen-unterstützte Aminolyse lieferte Thio-Deferipron **6** in einer Ausbeute von 66% über zwei Stufen. Die Variante über die temporäre Schätzung des Phenols **8** lieferte ebenfalls Zugang zum gewünschten Produkt, jedoch dieses in der letzten Stufen nicht ausreichend vom Katalysator-Rückstand abgetrennt werden.

Da die chelatisierende Wirkung von Deferipron und seinen Strukturanaloga bei medizinischen Applikation oft unerwünschte Nebenreaktionen, wie beispielsweise Eisen-Depletion hervorrufen kann, wurde zusätzlich eine Syntheseroute entwickelt, um ein „defunktionalisiertes Deferipron“ zu erhalten (Schema 3-3). Bei dieser Zielstruktur wurde das Phenol zu **15** defunktionalisiert. Hierzu wurden zwei Syntheserouten entwickelt und untersucht. Bei der ersten Route wurde zunächst Meldrumssäure **9** mittels Acetylchlorid zu **10** acetyliert.^[146,147] Es folgte eine Umacetalisierung mit *n*-Butylvinylether^[148] zu **11**, wobei dieses Intermediat in einer *one-pot*-Synthese zum γ -Pyranon **12** sauer hydrolysiert wurde.^[148,149] Anschließende Aminolyse mit wässriger Methylamin-Lösung lieferte schließlich die Zielstruktur **15** in 14% Gesamtausbeute über drei Stufen. In der zweiten, etwas kürzeren Route wurde zunächst 2-Methyl-4-nitropyridin **13** mittels Dimethylsulfat am Pyridin-Stickstoff methyliert und anschließend als Perchlorat-Salz **14** präzipitiert.^[150] Das isolierte *N*-Methylpyridinium-Salz **14** wurde anschließend in Ethanol mit einem basischen Ionentauscher (*Lewatit M500*) refluxiert, um das Derivat **15** zu erhalten.^[151] Mittels NMR-spektroskopischer Untersuchung dieser Reaktion (Zugabe von NaOD zu einer Lösung von **14** in DMSO- d_6) konnte nachgewiesen werden, dass diese Reaktion über einen Mechanismus der nukleophilen aromatischen Substitution ablaufen muss. Mittels 2D-NMR Methoden konnte die kurzzeitige Existenz des 1,4-Dihydropyridin-4-ols **I** bestätigt werden, welches sich bei Erwärmung der Lösung zu **15** umsetzte. Bei dieser Route konnte eine Gesamtausbeute von 22% über zwei Stufen erlangt werden, wobei der Einsatz des stark toxischen Dimethylsulfats hier nachteilig zu erwähnen ist.



Schema 3-3: Darstellung des „defunktionalisierten Deferiprons“ **15** über zwei mögliche Syntheserouten. **a:** Acylierung von Meldrumssäure **9** lieferte Verbindung **10**, welche mit *n*-Butylvinylether in das Acetal **10** überführt wurde. Dieses konnte *in situ* sauer zum γ -Pyranon **11** hydrolysiert werden. Abschließende Aminolyse mit wässriger Methylamin-Lösung lieferte schließlich **15**. **b:** Methylierung von 2-Methyl-4-Nitropyridin **13** resultiert im *N*-Methylpyridiniumsalz **14**, welches durch Umsetzung mit einem basischen Ionentauscher in einer zweistufigen Synthese zu **15** umgesetzt wurde.

Die in diesem Abschnitt dargestellten Deferipron-Derivate, bei denen entweder das *N*-Substitutionsmuster variiert oder der Keto-Sauerstoff in das entsprechende Thion überführt wurde, wurden alle samt im Jurkat-2D10 HIV-System auf ihre inhibitorische Wirkung getestet. Fokus wurde dabei auf die Fragestellung gelegt, inwiefern die Enzymdaten des Thio-Deferiprons **6** durch die Zellexperimente bestätigt werden konnte. Hierzu wurden zwei Zelllinien verwendet, Jurkat E6 und Jurkat 2D10. Bei Jurkat 2D10 Zellen handelt es sich dabei um immortalisierte HIV-Zellen, welche bei Virusexpression das grün-fluoreszierende Protein (GFP) exprimieren. Diese Expression kann durch die Zugabe von Tumor-Nekrosefaktor α (TNF- α) induziert werden.

E6-Zellen stellen das nicht infizierte Analogon zur genannten Zelllinie dar, sodass an dieser Linie Toxizität und Veränderung in der Zellstruktur, unabhängig von der Virusexpression, untersucht werden können. Analysiert wurde die jeweilige Zellsuspension mittels Durchflusszytometrie. Alle Datenpunkte wurden im Triplikat durchgeführt und zusammengefasst kann für die kleine Molekülbibliothek gesagt werden, dass mit Ausnahme des Thiomaltols **5** weder eine inhibitorische Wirkung der Verbindungen **4a-c** und **15**, noch eine Veränderung im Zytoskelett bzw. Toxizität gemessen werden konnte. Als Referenzverbindungen wurden Ciclopirox und Desferoxamin vermessen. Die gemessene P1-Viabilität bzw. die GFP-Expression bei der Behandlung von Jurkat-E6- bzw. Jurkat 2D10 HIV-Zellen mit und ohne TNF-Stimulation sind in Abbildung 3-1 gezeigt. In den mit TNF stimulierten HIV-Zellen ist auffällig, dass ab einer Konzentration von 25 μM eine starke Inhibierung der Aktivierung der Virusexpression eintritt. Dies geht einher mit einer sichtlichen Stressreaktion der Zellen verbunden, was daran deutlich wird, dass bei gleicher Konzentration in den unstimulierten Zellen die GFP-Expression deutlich ansteigt. Es in diesem Experiment keinerlei Toxizität beobachtet werden. Durch exponentielle Näherung der Messdaten der stimulierten Datenreihe kann eine 50%ige Inhibierung der Virusexpression bei einer Konzentration von 27 μM berechnet werden (Abbildung 3-1).

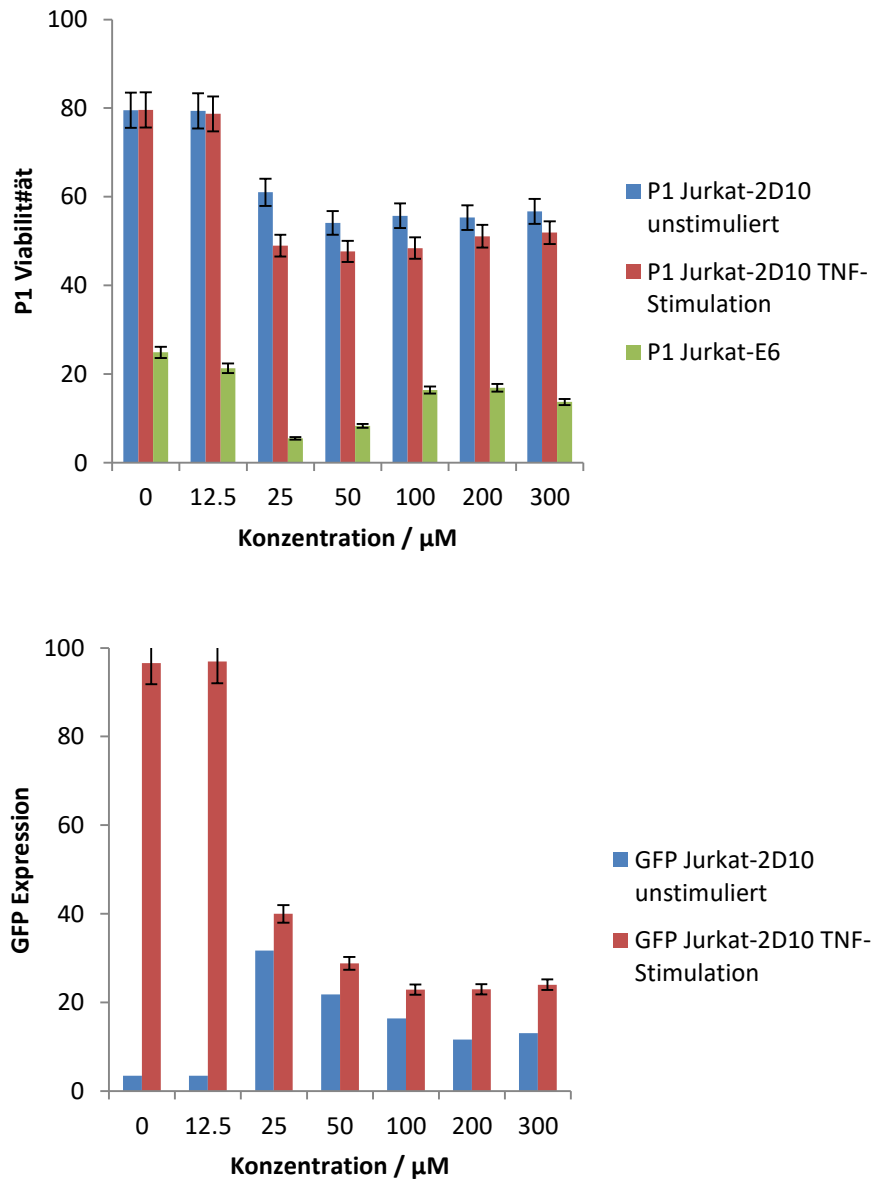


Abbildung 3-1: P1-Viabilität und %GFP Expression bei Behandlung der Jurkat-Zelllinien mit Thiomaltol **5**. Die Experimente wurden in 96 bzw. 384 *well-plates* durchgeführt. Als Medium diente RPMI-1640 mit jeweils 25 mM HEPES und L-Glutamin mit 5% fetalem Kälberserum (FBS) und 50 mg/mL Normicin. Jeder Messwert wurde in 100 μL Volumen mit ca. 30000 Zellen in Triplikaten aufgezeichnet.

Dieses Experiment wurde insgesamt dreifach wiederholt und kann somit eindeutig verifiziert werden. Zusätzlich wurde optische Mikroskopie durchgeführt, um die Verminderung der GFP-Expression auch zu visualisieren (Abbildung 3-2).

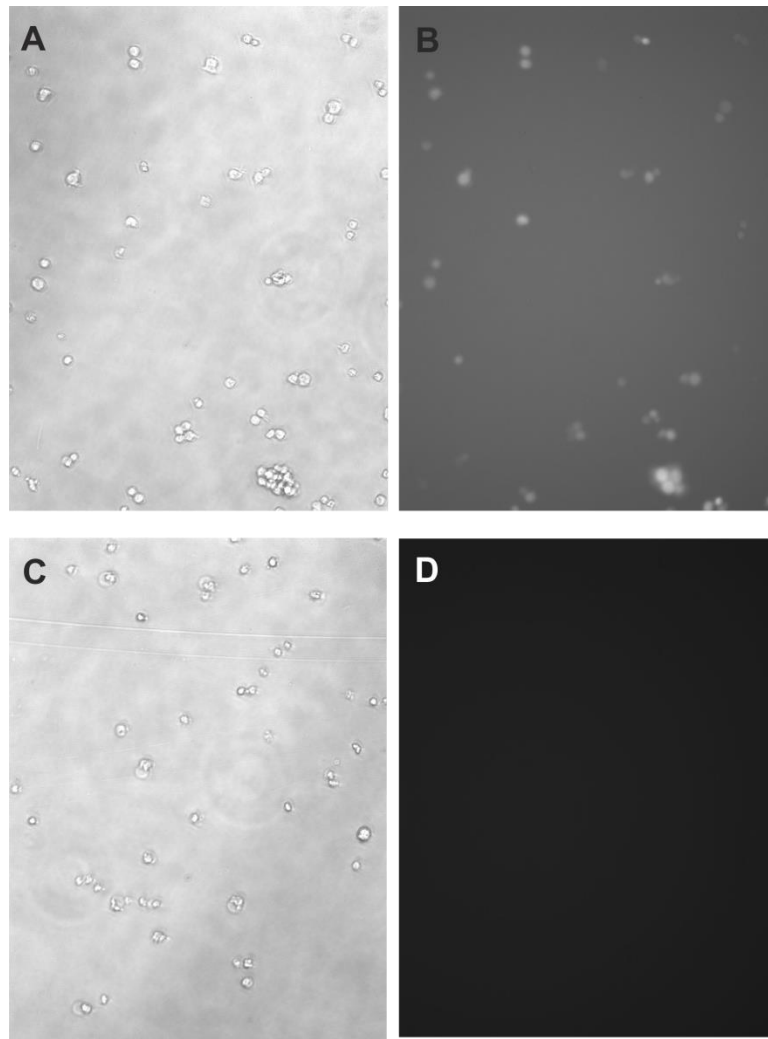


Abbildung 3-2: Behandlung von Jurkat 2D10 HIV-Zellen mit Thiomaltol: **A:** Blind-Messung ohne Thiomaltol **5** Zugabe, jedoch mit TNF-Stimulation: **B:** Entsprechende Schwarzfiter-Aufnahme: Die GFP-markierten Zellen sind als weiße Punkte sichtbar. **C:** Behandlung der Zellen mit 100 µM Thiomaltol **5** bei TNF-Stimulation. **D:** Zugehörige Schwarzfiter-Aufnahme.

In den in Abbildung 3-2 gezeigten Experimenten wurden Jurkat-2D10 Zellen identisch behandelt wie in den dazugehörigen Durchflusszytometrie Experimenten. Auch die Zelldichte mit ca. 30000 Zellen pro Experiment wurde beibehalten. Die Virusexpression wurde mit TNF aktiviert. Es sind Aufnahmen ohne Thiomaltol-Behandlung (**A** und **B**), sowie die Behandlung mit 100 µM Thiomaltol (**C** und **D**) gezeigt. Da es sich hierbei nur um ein Schwarz-Weiß-Mikroskop ohne entsprechende Fluoreszenz-Filter handelte, ist die GFP Expression nur in den Schwarzfiter-Aufnahmen **B** und **D** als weiße Punkte zu erkennen.

Als Referenz dazu sind die entsprechenden ungefilterten Aufnahmen **A** und **C** gezeigt. In den Aufnahmen wird die Abwesenheit der GFP-Fluoreszenz bei Behandlung mit Thiomaltol **5** im Bild **D** deutlich, was die vorhergehenden Experimenten in der Durchflusszytometrie bestätigt.

Zusammenfassend kann in diesem Abschnitt gesagt werden, dass Thiomaltol **5** im Gegensatz zu seinem Deferipron-Analogon eine starke Aktivität im HIV-Zellsystem zeigt, die die Aktivität einiger bereits zugelassener Medikamente, wie beispielsweise Deferipron, Ciclopirox oder Desferoxamin, deutlich übersteigt.^[67,152] Die Messungen konnten durch mikroskopische Aufnahmen bestätigt werden. Hierzu wäre die Anwendung des Thiomaltols in einem Radioimmunoassay am aufgereinigten Enzym der Hydroxylase im Vergleich zu Thio-Deferipron **6** denkbar. Weitergehend sollte der genaue Wirkmechanismus des Thiomaltols **5** aufgeklärt werden, um feststellen zu können, zu welchem Zeitpunkt des Zellzyklus der Wirkstoff eingreift. Für Deferipron ist bekannt, dass dieser an der Grenzfläche zwischen *G1*- und *S*-Phase inhibiert.^[69] Auch die Untersuchung der entsprechenden Zellproliferation könnte weitere Erkenntnisse liefern.

4. Design der eif5a basierten β -hairpin Peptide

Vorangegangene Studien zeigten, dass die Hydroxylase durch Tetrapeptide des Typs GKHG inhibiert werden kann, wobei die K²-Seitenkette eine Catechol-Funktion aufwies.^[16] Da diese Peptide auch keine definierte Sekundärstruktur aufwiesen, konnte unter der Annahme, dass die Konformation dieses Peptids in Lösung auch der gebundenen Konformation entspricht, diese Verbindungsklasse nur bedingt dafür genutzt werden, die *active site* des Enzyms strukturell zu erforschen. Unter der Voraussetzung, dass die Lösungskonformation auch der aktiven Konformation entspricht wurde ein Ansatz verfolgt, um formstabile Peptide darzustellen, welche die Sekundärstruktur des eif5a in der publizierten Kristallstruktur nachempfinden und daher auch zum *Mapping* der *active site* dienlich sein können. Wird die β -hairpin Sequenz S⁴⁴-H⁵⁷ (nachfolgend S¹-H¹⁴) des eif5a in der automatisierten Festphasenpeptidsynthese synthetisiert, so wird das Peptid **P1** erhalten, welches nach NMR-Analyse keine bevorzugte Konformation bzw. stabile Sekundärstruktur aufweist. Das Fragment verliert also ohne seine natürliche Proteinumgebung seine dreidimensionale Faltung. Abbildung 4-1 zeigt die Struktur des synthetischen Ausschnitts des β -hairpin Fragments **P1** des eif5a-Proteins. Das dazugehörige ¹H-NMR Spektrum von **P1** zeigt keine große Dispersion im amidischen Bereich, weshalb von einer *random-coil* Struktur ausgegangen werden kann.

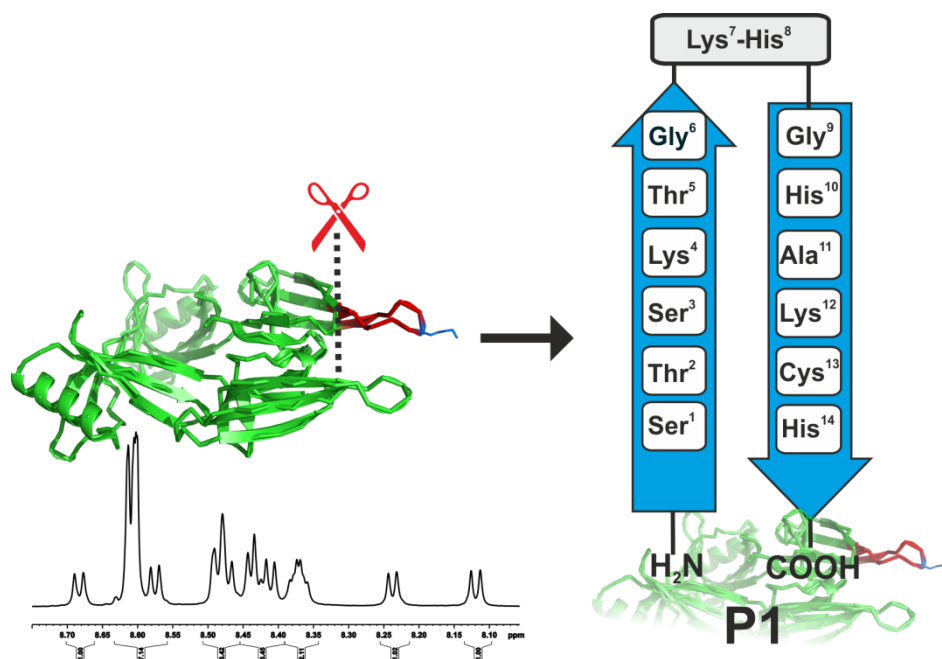


Abbildung 4-1: Synthese des 14 Aminosäure eif5a Fragments **P1**: Ausgehend von der eif5a Kristallstruktur wurde die Aminosäuresequenz ausgewählt und synthetisiert. Mittels NMR-Analyse konnte gefunden werden, dass es sich dabei nicht um die in der Kristallstruktur enthaltene β -hairpin Struktur handelt. Der 14 AS Ausschnitt

wurde hier im Einklang mit der zuvor diskutierten $4n+2$ -Regel ausgewählt. Zur Stabilisierung der gewünschten hairpin-Struktur wurde das gewählte eif5a-Fragment mit dem hydrophoben Cluster kombiniert. Hierzu wurden sechs Aminosäuren ($n=1$) des Proteins mit entsprechenden acht Aminosäuren des Clusters kombiniert, sodass das resultierende Peptid wieder der $4n+2$ -Regel ($n=3$) entspricht.

Da auch die Zyklisierung von Peptid **P1** mittels Disulfid oder Macrolactam keine erhebliche Stabilisierung der Peptidstruktur herbeiführte, musste eine neue Strategie entwickelt werden. Hierzu wurde das Prinzip des *epitope graftings* angewendet, indem die sechs Aminosäuren des eif5a T⁴⁸-H⁵²-Epitops (T⁵-H¹⁰ in Abb. 4-2 in blau) mit den Aminosäuren C¹-E⁴+K¹¹-C¹⁴ des hydrophoben Clusters (gelb) von Cochran *et al.* modular kombiniert wurden, welcher speziell zum Display von β -hairpin-Struktur entwickelt wurde.^[90,106] Abbildung 4-2 zeigt die Vorgehensweise.

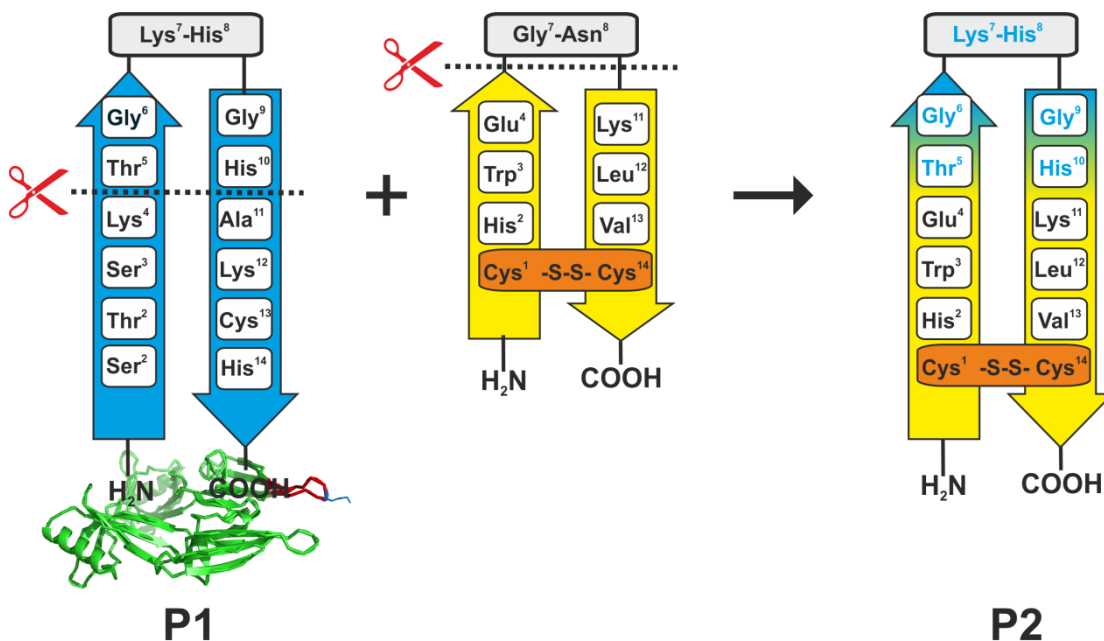


Abbildung 4-2: Modularer Kombination der Epitop-Aminosäuren des eif5a-Proteins (blau) mit entsprechenden Cluster-Aminosäuren des hydrophoben Clusters (gelb) entlang der Stränge: Nach Oxidation in wässrig basischem Puffer kommt es zur Ausbildung des intramolekularen Disulfids (orange) und der damit verbundenen Ausbildung der Sekundärstruktur in **P2**.

Die intramolekulare Oxidation der beiden terminalen Cysteine erfolgte in wässrigem Ammoniumcarbonat-Puffer. Nach HPLC-Aufreinigung wurde das Peptid **P2** in sehr guter Ausbeute und Reinheit erhalten. Die entsprechenden ¹H-NMR Spektren der Peptide **P1** und **P2** sind in Abbildung 4-3 gezeigt.

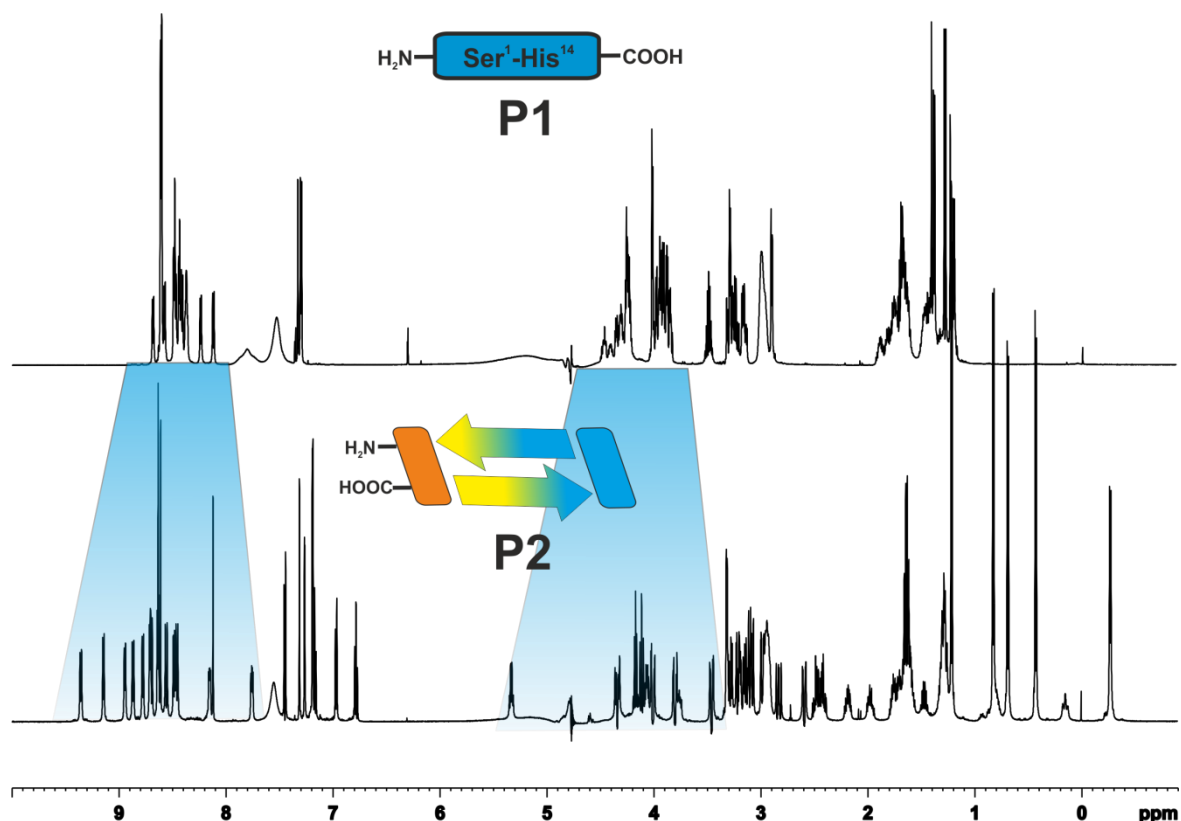


Abbildung 4-3: Vergleich der ^1H -NMR Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/ D_2O 9:1, pH 3.0) von **P1** und **P2**: Die Dispersion im Amid-Bereich erhöht sich deutlich im Zuge des *epitope graftings*. Zusätzlich zeigen die hohe Dispersion der α -Protonen, sowie die deutliche Tieffeldverschiebung von $\text{L}^{12}\text{-}\delta\text{-CH}_3$ in **P2**, die Ausbildung der β -hairpin Struktur (Indol- ϵ -NH von W^3 bei ca. 10.2 ppm ist hier nicht gezeigt).

Im ^1H -NMR Spektrum von **P2** ist die hohe Dispersion der Amidprotonen, sowie die Dispersion der $\text{L}^{12}\text{-}\delta\text{-CH}_3$ -Gruppen ein Indiz dafür, dass es sich hierbei um den gewünschten β -hairpin handelt. Bei Ausbildung dieser Struktur richtet sich eine der beiden diastereotopen Methylgruppen des Leu^{12} in Richtung des Indols von Trp^3 aus und erfährt durch einen Ringstromeffekt eine starke elektronische Abschirmung, was in der Hochfeldverschiebung des entsprechenden Resonanzsignals resultiert.^[4,106] Mittels *sequential walk* können alle Signale aus dem Spektrum von **P2** eindeutig zugeordnet werden. Die Methodik dazu ist in Abbildung 4-4 gezeigt.

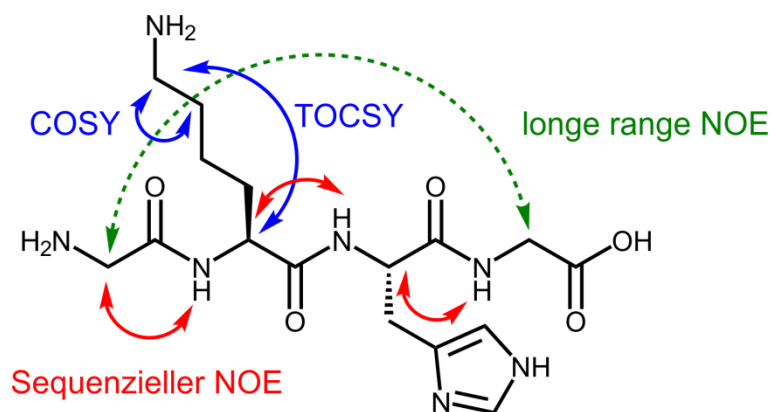


Abbildung 4-4: *Sequential walk* von β -hairpin Peptiden am H-GKHG-OH-Modellpeptid: Charakteristisch für diese Sekundärstruktur ist ein starker NOE-Kontakt zwischen dem α -Protonen der ersten Aminosäure und dem Amid-Protonen der darauffolgenden Aminosäure (von *N*- nach *C*-Terminus) und ein schwacher NOE zum eigenen Amid-Proton. COSY Spektren zeigen Kreuzsignale bei geminalen Kopplungen, während TOCSY-Spektren die Identifikation kompletter Spinsysteme ermöglichen, sodass die Zuordnung der einzelnen Aminosäure-Fragmente möglich ist.

COSY- und TOCSY-Spektren liefern Kreuzsignale basierend auf skalaren Kopplungen, während NOESY-Spektren durch dipolare Kopplungen Kreuzsignale liefern, welche Aufschluss über die räumliche Anordnung der Protonen relativ zueinander geben. Charakteristisch für β -hairpin Strukturen ist der sequenzielle NOE-Kontakt von einem α -Proton der ersten Aminosäure zum amidischen NH der darauffolgenden Aminosäure in Richtung vom *N*- zum *C*-Terminus. In Kombination mit dem TOCSY Spektrum kann somit das ^1H -NMR Spektrum bei ausreichender Dispersion komplett zugeordnet werden. Die komplette Methodik der Sequenzierung mit Hilfe der genannten Spektren ist in Abbildung 4-5 exemplarisch für das Peptid **P2** gezeigt.

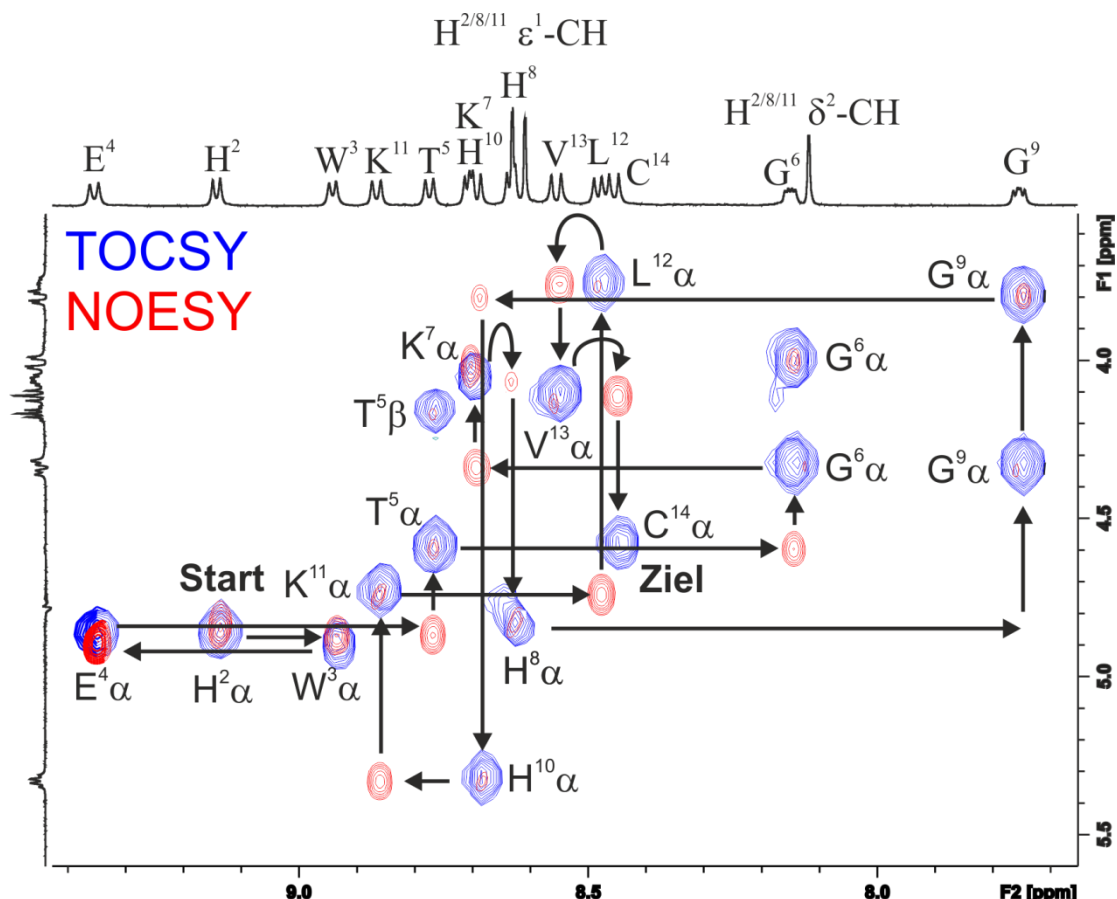


Abbildung 4-5: Überlagerung von TOCSY- (blau) und NOESY- (rot) Spektrum (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) von Peptid **P2**: Durch die sequenziellen NOE-Kontakte gemäß Abbildung 4-4 können alle amidischen Protonen der gewünschten Peptidsequenz eindeutig zugeordnet werden. Die entsprechenden skalaren Kopplungen aus dem TOCSY Spektrum lassen anschließend die vollständige Zuordnung der Seitenketten-Signale zu. (Der NOE-Kontakt zwischen His⁸ α -CH und Gly⁹-NH ist nur sehr schwach sichtbar und hier aus Gründen der Übersicht nicht gezeigt).

Der vollständig zugeordnete Amidbereich des Peptids **P2** ist in Abbildung 4-6 gezeigt. Auffällig dabei ist besonders das doppelte Glycin-Muster in den Positionen i und $i+3$ der *turn*-Struktur. Dieses Strukturmotiv ist in der Natur sehr ungewöhnlich und auch der von Lys⁷ und His⁸ gebildete *turn* ist ausschließlich im eif5a-Protein zu finden. Bei Betrachtung der beiden Glycin-Amidsignale wird deutlich, dass diese jeweils als *dd*-Multiplizität erscheinen, sie somit also in einer bevorzugten Konformation vorliegen. Eine gemittelte Konformation würde sich in zwei ähnlichen Kopplungskonstanten widerspiegeln, was eine Triplet-Multiplizität zur Folge hätte. Diese Beobachtung kann bei Betrachtung der diastereotopen Aufspaltung der dazugehörigen α -Protonen bestätigt werden.

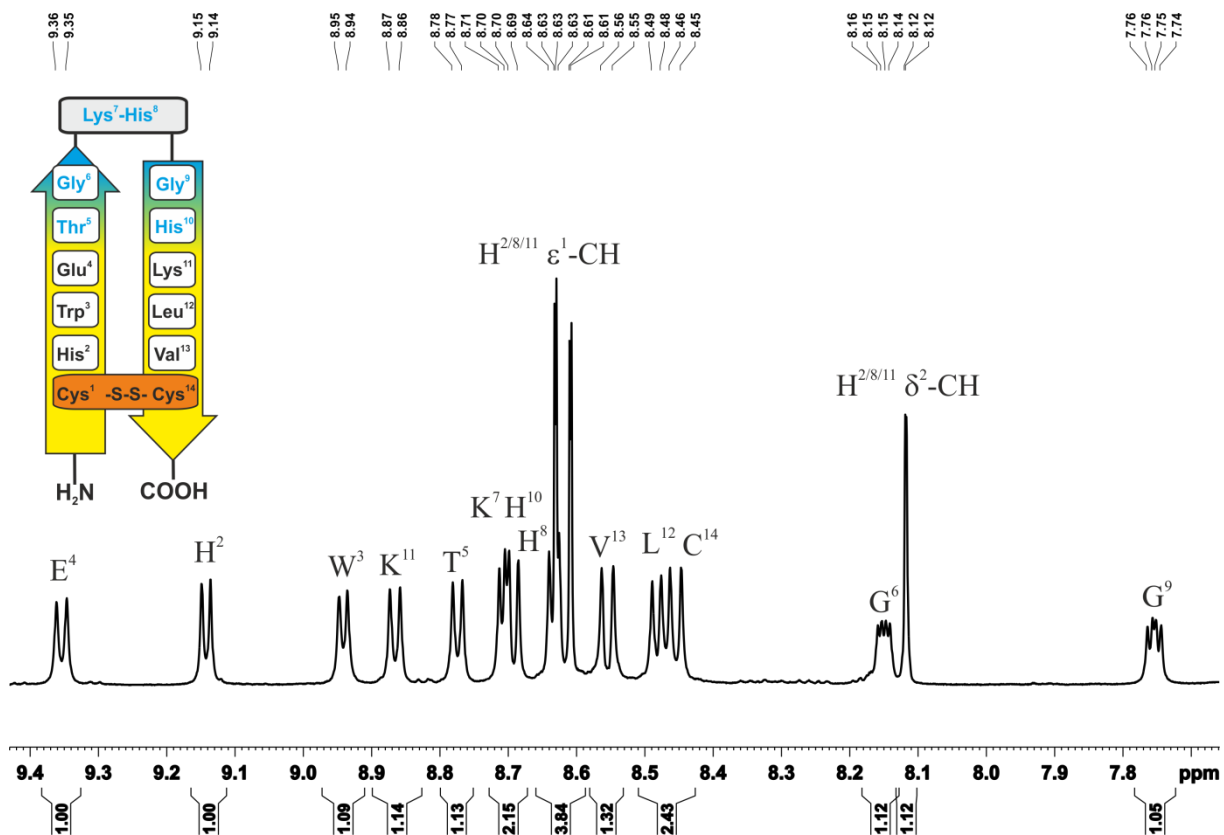


Abbildung 4-6: Amidbereich des ^1H -NMR Spektrums (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/ D_2O 9:1, pH 3.0) von Peptid **P2**.

Ausgehend von sowohl der hohen Dispersion im Amid- als auch im aliphatischen Bereich des Peptids, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine formstabile, zyklische Struktur handelt. Die Verifizierung, dass sich erfolgreich ein β -hairpin mit zwei antiparallel ausgerichteten Strängen ausgebildet hat, erfolgt erneut durch das NOESY-Spektrum. Alle von amidischen Protonen ausgehenden, strukturelevanten NH/NH, NH/ α -CH und α -CH/ α -CH sichtbaren NOE-Kontakte sind in Abbildung 4-7 gezeigt.

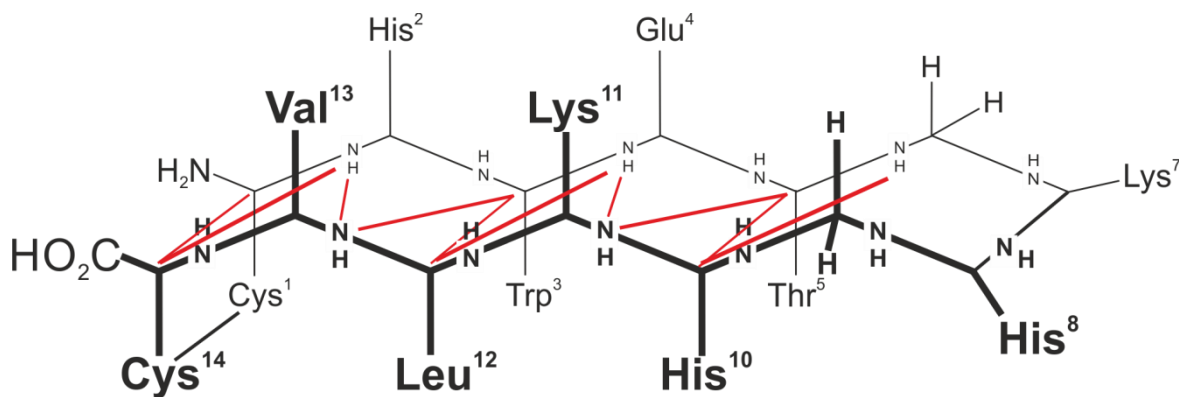


Abbildung 4-7: Schematische Darstellung der strukturelevanten *interstrand* NOE-Kontakte des Peptids **P2**: Die hier gezeigte ZickZack-Darstellung zeigt alle Wasserstoffbrücken-bindenden Aminosäurereste überhalb, sowie alle nicht-bindenden Reste unterhalb des Peptidrückgrats. Farblich hervorgehoben sind die für β -hairpin charakteristischen *interstrand*-Kontakte.

Besonders wichtig sind dabei die sogenannten *interstrand*-NOE-Kontakte, mit deren Anwesenheit das Vorliegen der β -hairpin-Struktur bestätigt werden kann. Wird von diesem Strukturmotiv ausgegangen, so befinden sich immer paarweise, gegenüberliegende amidische Protonen in einer Wasserstoffbrücken-Bindung. Im Detail sind dies für Peptid **P2** die amidischen Signale von His²/Val¹³, Glu⁴/Lys¹¹, Gly⁶/Gly⁹, während Cys¹, Trp³, Thr⁵, Lys⁷, His⁸, His¹⁰, Leu¹² und Cys¹⁴ zum Lösungsmittel hin orientiert sind (Abbildung 4-7). Daraus resultiert ein wiederkehrendes NOE-Muster innerhalb der beiden Stränge: Das α -CH von Cys¹ sollte demnach ein Kreuzsignal zum α -CH von Cys¹⁴ aufweisen. Dieses Proton wiederum sollte nun einen Kontakt zu His²-NH zeigen, da dieses Amidproton sich in einer Wasserstoffbrücke befindet und damit zum Inneren des *hairpin*-Makrozyklus hin orientiert ist. Gleiches gilt für Leu¹²-NH, weshalb daraus der nächste, strukturelevante NOE-Kontakt zwischen His²-NH und Leu¹²-NH resultiert. Sinngemäß folgt darauf der NOE-Kontakt zwischen Leu¹² α -CH und dem amidischen Proton von Glu⁴. Diese Abfolge kann theoretisch bis in den *turn*-Bereich nachvollzogen werden. Aus dem NOE-Spektrum von **P2** können all diese Kontakte bis hin zu Gly⁶-NH verifiziert werden. In Abbildung 4-7 sind diese NOE-Kontakte rot markiert.

Weitere Strukturelevante NOE-Kontakte der Aminosäure-Seitenketten sind in Abbildung 4-8 verdeutlicht. Diese bilden die Basis für einen dreidimensionalen Strukturvorschlag.

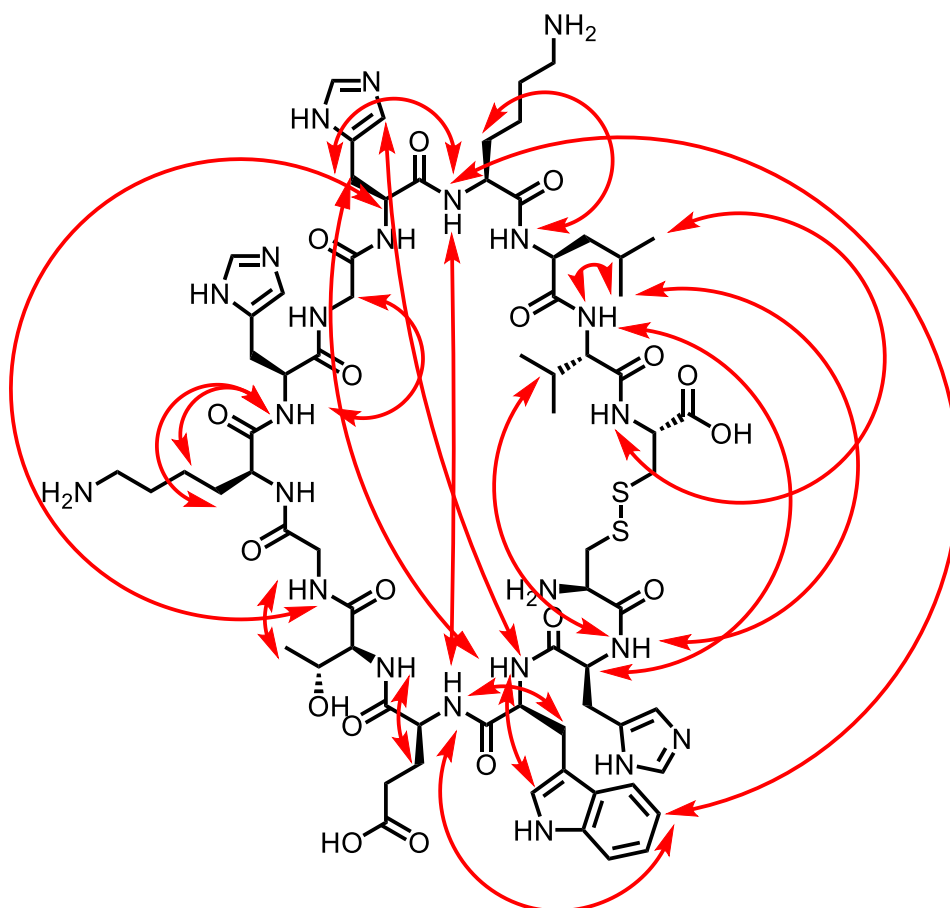


Abbildung 4-8: Sichtbare, strukturelevante NOE-Kontakte des Peptids **P2**, welche die Basis für die Berechnung eines dreidimensionalen Strukturvorschlags des Peptids bilden.

Auch das so vorhergesagte Netzwerk von Wasserstoffbrücken-Bindungen kann mittels temperaturabhängiger NMR-Spektroskopie bestätigt werden. Der Temperaturkoeffizient ($\Delta\delta/\Delta T$) ist vom Abstand zwischen jenem Amidproton und dem gegenüberliegenden Protonenakzeptor, hier der entsprechende Carbonylsauerstoff, abhängig. Durch Steigerung der *Brownschen* Molekularbewegung bei zunehmender Temperatur wird die Bindungslänge der Wasserstoffbrücken-Bindung erhöht und der entschirmende Effekt des Carbonylsauerstoffs wird verringert, wodurch es zu einer relativen Hochfeldverschiebung der Amidsignale kommt. Dieser Effekt ist für intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen mit dem umgebenden Wasser deutlich stärker als für intramolekulare Brücken. Demnach können intramolekulare Wasserstoffbrücken-Bindungen in einer β -hairpin-Struktur durch ihren Temperaturkoeffizienten ($\Delta\delta/\Delta T < -4.5$ ppb/K) identifiziert und von intermolekularen Wasserstoffbrücken, also solventexponierten Amidprotonen unterschieden werden.^[106,153] Dies ermöglicht jedoch lediglich eine qualitative Aussage, die Population dieser Wasserstoffbrücken-Bindung kann nicht quantifiziert werden. Die Temperaturabhängigkeit der Amidprotonen für **P2** ist in Abbildung 4-9 gezeigt. Lineare Extrapolation der

Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Amidprotonen liefert die dazugehörigen Temperaturkoeffizienten in Abbildung 4-10.

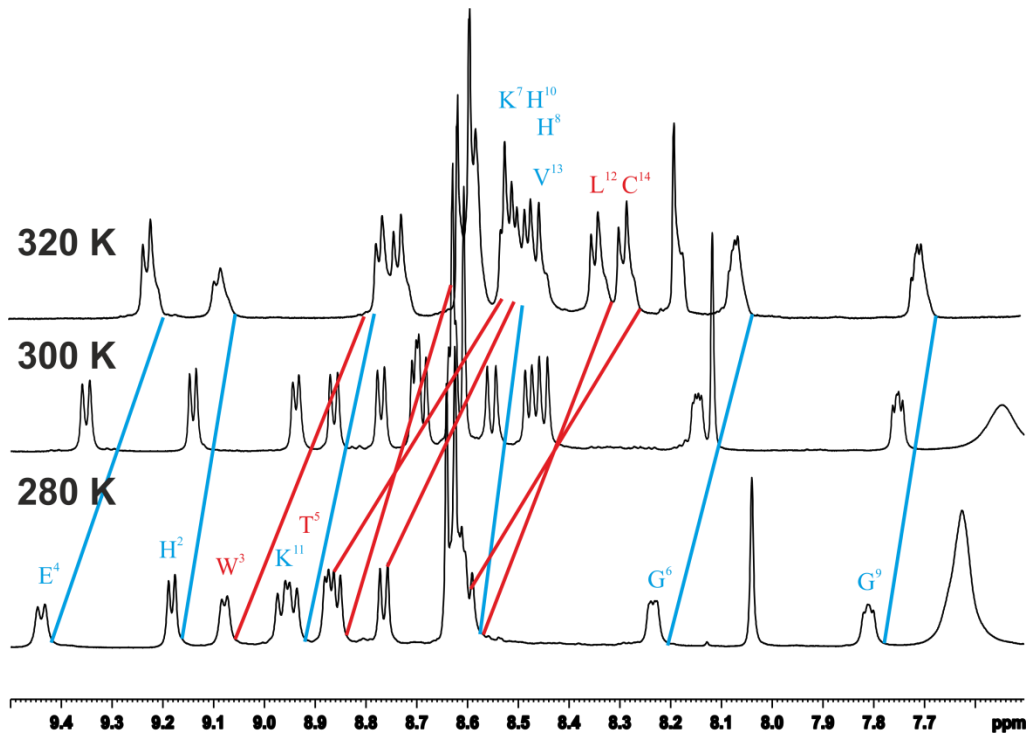


Abbildung 4-9: Amidbereich des ^1H -NMR-Spektrums (600 MHz, 50 mM Phosphat/ D_2O 9:1, pH 3.0) von Peptid **P2**. Es ist deutlich die unterschiedliche Temperaturabhängigkeit für wasserstoffbrücken-gebundene Amidprotonen (blau) und solventexponierten Amidprotonen (rot) erkennbar.

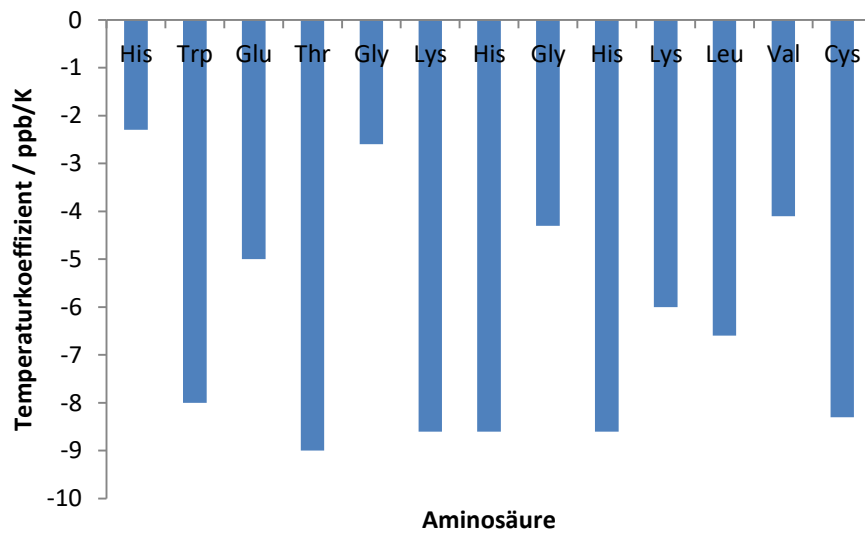


Abbildung 4-10: Temperaturkoeffizienten der Amidprotonen von Peptid **P2**.

Es wird deutlich, dass alle, laut dem in Abbildung 4-10 gezeigten Modell, wasserstoffbrücken-gebundenen Amidprotonen einen deutlich geringeren Temperaturkoeffizienten aufweisen als die entsprechend zum Wasser exponierten Protonen. Auch im Vergleich mit dem Modellpeptid von *Cochran et al.* werden ähnliche Temperaturkoeffizienten für die wasserstoffbrücken-gebundenen Amidprotonen der Aminosäuren His², Glu⁴, Lys¹¹ und Val¹³ erhalten.^[105,106] Auffällig dabei ist, dass His² in **P2** einen deutlich niedrigeren Temperaturkoeffizienten hat, während sich das gegenüberliegende Val¹³ genau gegenläufig verhält. Die Auftragung ist in Abbildung 4-11 gezeigt.

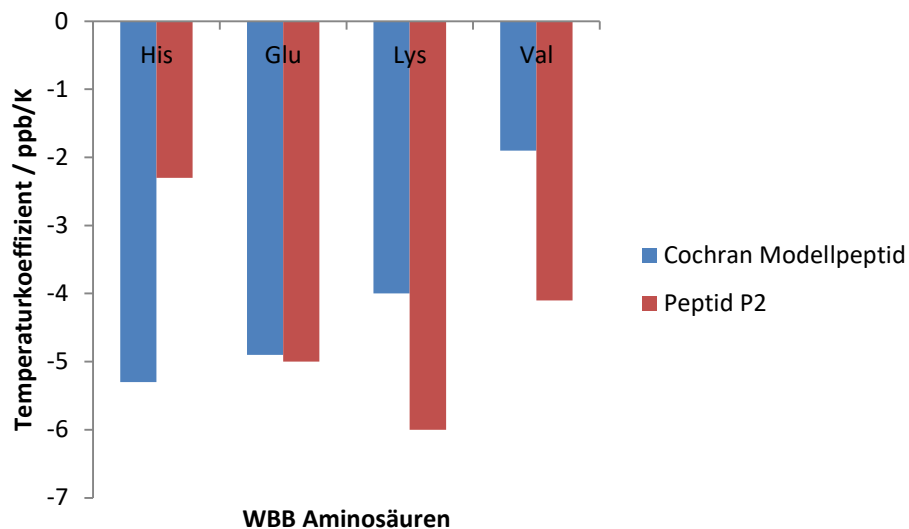


Abbildung 4-11: Temperaturkoeffizienten (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) von Peptid **P2** im Vergleich zu *Cochrans* Modellpeptid.

4.1 Charakterisierung des β -turns in P2

Ein β -turn besteht aus vier Aminosäuren, welche im Fall von **P2** die Aminosäuren Gly⁶, Lys⁷, His⁸ und Gly⁹ sind. Nach Venkatachalam kann die geometrische Anordnung dieser vier Aminosäuren in drei Typen klassifiziert werden.^[81] Diese werden in Abhängigkeit vom ϕ - und ψ -Winkel der Aminosäuren $i+1$ (Lys⁷ für **P2**) und $i+2$ (His⁸ für **P2**) definiert. Die Winkel für die Typen I, II und III sind in Tabelle 4-1 gezeigt.

Tabelle 4-1: ϕ - und ψ -Winkel für die drei β -turn Typen nach Venkatachalam.^[81]

Typ	ϕ -Winkel ($i+1$)	ϕ -Winkel ($i+2$)	ψ -Winkel ($i+1$)	ψ -Winkel ($i+2$)
Typ I	-60°	-80°	-30°	0°
Typ II	-60°	80°	-120°	0°
Typ III	-60°	-60°	-30°	-30°

Während Typ III die kleinste Untereinheit einer 3_{10} -Helix darstellt, bewirken die Typen I und II eine nichthelikale Richtungsänderung im Peptidrückgrat. Die Spiegelbilder von Typ I und Typ II, bei welchen die Winkel jeweils invertiert sind, werden als Typ I' und Typ II' bezeichnet. Die Typen I' und II' werden sehr oft in β -hairpin Strukturen gefunden, da deren 45° Verdrillung sehr gut kompartibel ist mit der rechtsgängigen Verdrillung der hairpins. Die Stereochemie der Aminosäuren in den Positionen $i+1$ und $i+2$ kann ein Hinweis auf den Typen des turns liefern. Die Kombination L-L liefert den Typ I, D-D zu Typ I', L-D zum Typen II und D-L zum Typ II'. Die turn-Induktion dieser beiden Aminosäuren bestimmt die Stabilität des gesamten hairpins und dessen Faltungsgeschwindigkeit. Aufgrund der flexiblen Torsionswinkel tritt Glycin sehr oft in einer dieser beiden Positionen in hairpins der Typen I', II und II' auf. Prolin hingegen wird oft in der $i+1$ Position von Typ I und II gefunden bzw. in der $i+2$ Position vom Typs II'. Stäbchenmodelle dieser vier Typen sind in Abbildung 4-12 gezeigt.^[86]

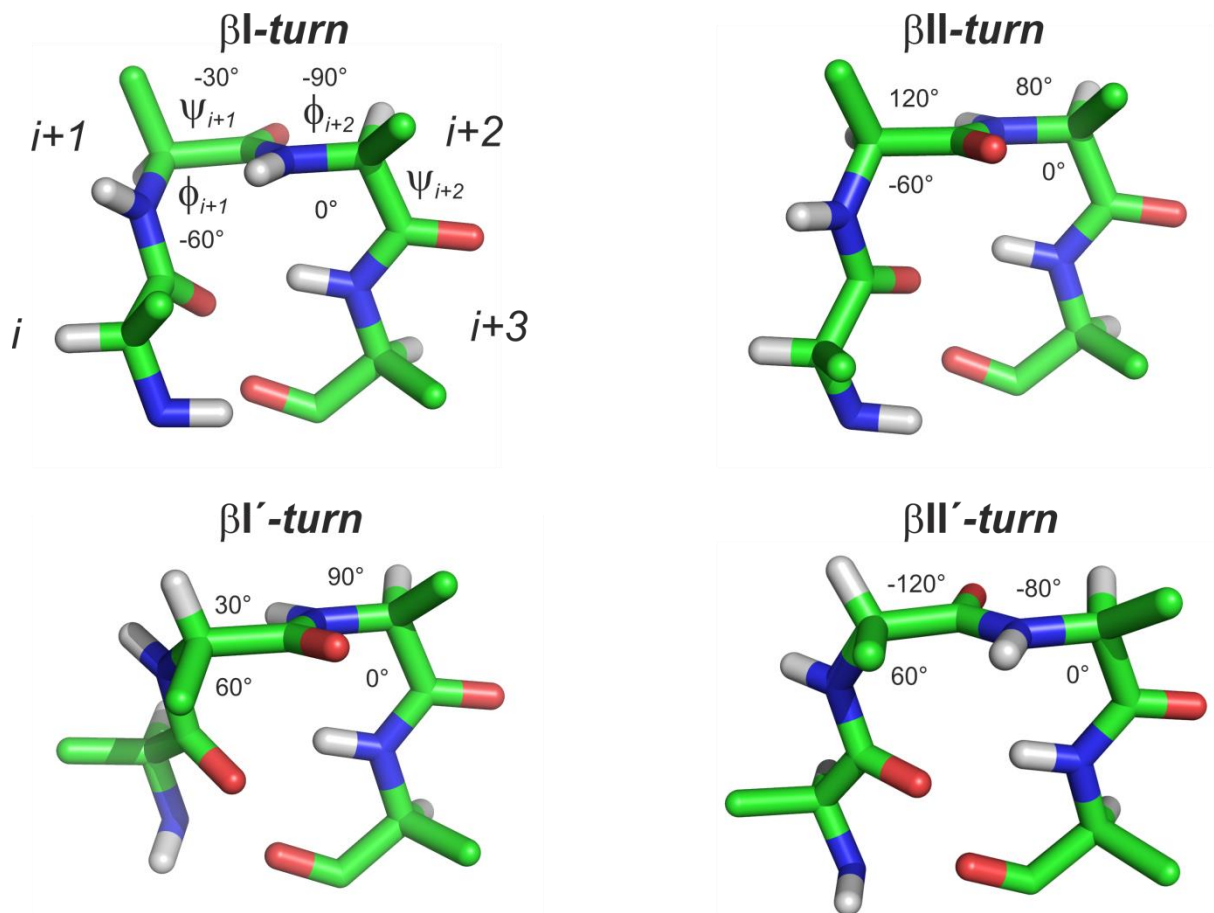


Abbildung 4-12: Geometrische Anordnung der beschriebenen Typen eines β -turns.^[86]

Um nun den Typus des β -turns im Peptid **P2** bestimmen zu können, ist es hilfreich, zunächst auf Kristallstrukturen des eif5a-Proteins zurückzugreifen, da das hier angewandte Design des β -hairpin Epitops auf Basis der publizierten Strukturen beruht. Hierbei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass in Proteinumgebungen fast ausschließlich die Typen I und II beobachtet werden. Im Vergleich der *turn*-Struktur aus der Kristallstruktur (pdb: 3hks) mit den in Abbildung 4-12 Modellen der vier β -hairpin Typen wird deutlich, dass besonders die kurzen NH-NH Abstände zwischen den Aminosäuren i (Gly⁴⁹ in 3hks, Gly⁶ in **P2**) und $i+1$ (Lys⁵⁰ in 3hks, Lys⁷ in **P2**) mit 2.79 Å, sowie zwischen $i+2$ (His⁵¹ in 3hks, His⁸ in **P2**) und $i+3$ (Gly⁵² in 3hks, Gly⁹ in **P2**) mit 2.76 Å auf einen β -turn des Typus I in der Kristallstruktur hinweisen (Abbildung 4-13). Auch die Kombination zweier L-konfigurierter Aminosäuren in den Positionen $i+1$ und $i+2$ deutet auf diesen Typus hin. Auffällig dabei ist jedoch das Exposition von Lys⁵⁰, was an die weniger bekannten Struktur motive eines β -bulges bzw. eines A4-residue-hairpins erinnert.^[154]

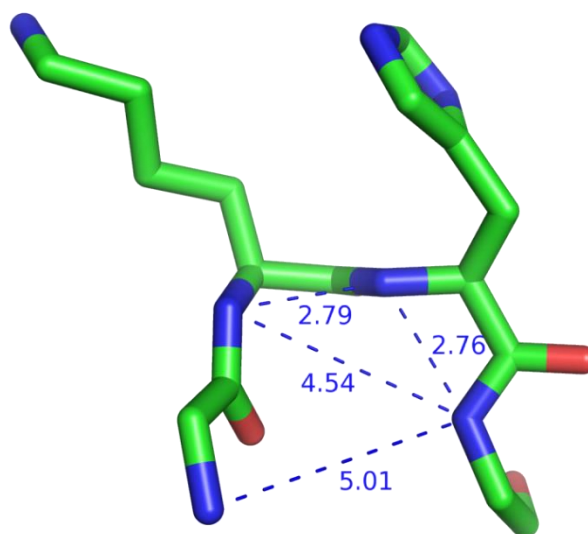


Abbildung 4-13: β -turn Struktur des eif5a-Proteins in der Kristallstruktur: Die NH-NH Abstände von Gly⁴⁹ zu Lys⁵⁰, sowie von His⁵¹ zu Gly⁵² implizieren einen β -turn des Typus I (pdb: 3hks), wobei die Exposition von Lys⁵⁰ eine ungewöhnliche β -turn Konformation vermuten lässt.

Aus dem NOESY-Spektrum von **P2** kann nur das Kreuzsignal zwischen His⁸-NH und Gly⁹-NH verifiziert werden. Die hier ebenso präsente Kombination zweier L-konfigurierter Aminosäuren in den Positionen $i+1$ und $i+2$ ist ein weiteres Indiz für einen β I-turn bzw. β I'-turn. Eine weitere Möglichkeit die zur strukturellen Evaluation des designten Epitops im Peptid **P2** in Betracht gezogen werden muss, ist die Ausbildung eines weniger üblichen, zuvor bereits genannten *A4 residue hairpin* oder die Ausbildung eines β -bulges. In β -bulges wird das lokale Wasserstoffbrückenbindungs-Muster eines β -hairpins durch die Insertion weiterer Aminosäurereste auf einer oder auf beiden Seiten der Stränge verändert. In klassischen β -hairpins kommt es, wie bereits gezeigt, an den beiden Enden der β -Stränge, unmittelbar vor dem turn-Bereich zur Ausbildung einer einzigen Wasserstoffbrücke. Die verknüpfenden drei turn-Aminosäuren zeigen charakteristische Konformationen, die im *Ramachandran*-Plot verdeutlicht werden können. Während die erste Aminosäure eine rechtsgängige, α -helikale Konformation annimmt, liegt die Konformation der zweiten Aminosäure zwischen einer helikalen und β -sheet-artigen Struktur. Glycin, Asparagin oder Aspartat sind oft in der letzten Position zu finden, wobei diese Aminosäuren die Konformation einer linksgängigen Helix einnehmen. Im *A4 residue hairpin* nehmen die ersten beiden Aminosäuren eine Konformation einer rechtsgängigen α -Helix ein, die Konformation der dritten Aminosäure liegt zwischen rechtsgängig α -helikal und β -sheet, während die letzte Aminosäure die Konformation einer

linksgängigen α -Helix im *Ramachandran*-Plot zeigt. Beide Strukturen sind in Abbildung 4-14 gezeigt.

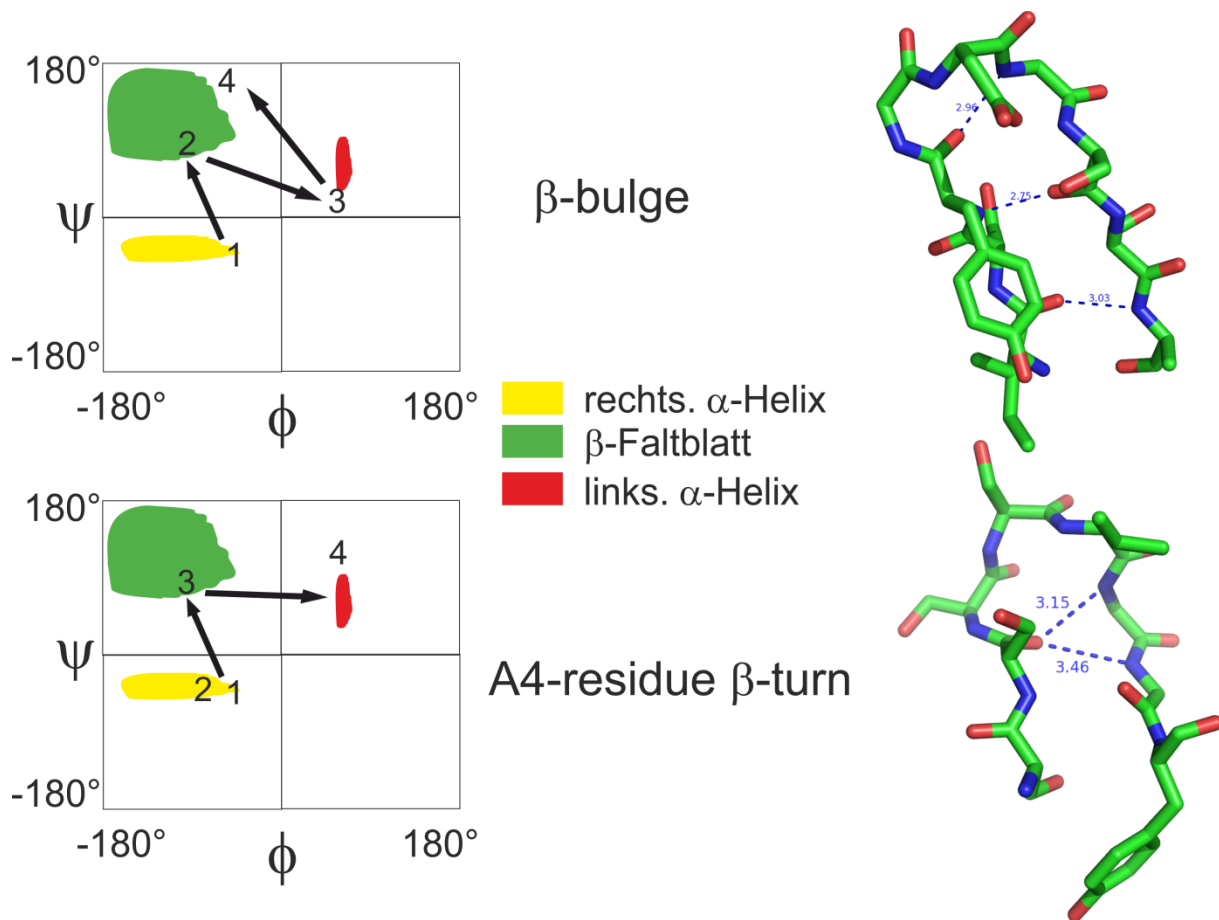


Abbildung 4-14: *Ramachandran*-Plot für die konformationelle Abfolge der Aminosäurereste in β -bulges und A4-residue turns.

Das Muster der NOE-Kontakte im *turn*-Bereich vom Peptid **P2** lässt aber die Zuordnung der *turn*-Struktur zum Typus I oder II' zu, während die Identifikation der *turn*-Struktur in den eif5a-Kristallstrukturen auch die Annahme eines A4-residue-hairpins möglich erscheinen lassen. Durch das hier angewandte Epitop-Design mittels Grafting des eif5a-loops an den hydrophoben Cluster kann also vermutet werden, dass die etwas unübliche Struktur des A4-residue-hairpins aus der Kristallstruktur in einen klassischen hairpin im hier dargestellten Peptid **P2** überführt wird. Um weitergehend ein präzises Strukturmodell für **P2** entwickeln zu können, wurden D-Aminosäuren im *turn*-Bereich untersucht und Ala-Mutationen durchgeführt.

4.2 D-konfigurierte Aminosäuren des β -turns

Es ist bekannt, dass D-konfigurierte Aminosäuren in den Positionen $i+1$ bzw. $i+2$ *turn*-induzierende Eigenschaften haben. Um die Frage nach der Existenz einer Korrelation zwischen der Beweglichkeit von Gly⁶ und Gly⁹ und der Faltungspopulation der *hairpins* nachgehen zu können, wurden jeweils die Peptide **P3** (lys⁷) und **P4** (his⁸) mit den entsprechenden D-Aminosäuren in den Positionen $i+1$ und $i+2$ dargestellt. Zusätzlich lassen sich aus diesen Mutationen Informationen bezüglich des Typus dieses *turns* gewinnen. Dabei ist bekannt, dass die Aminosäure-Kombination L-D im *turn* zum Typen II und D-L zum Typ II' führt. Ein Ausschnitt des Amidbereichs der ¹H-NMR Spektren der Peptide **P2**, **P3** und **P4** ist in Abbildung 4-15 gezeigt.

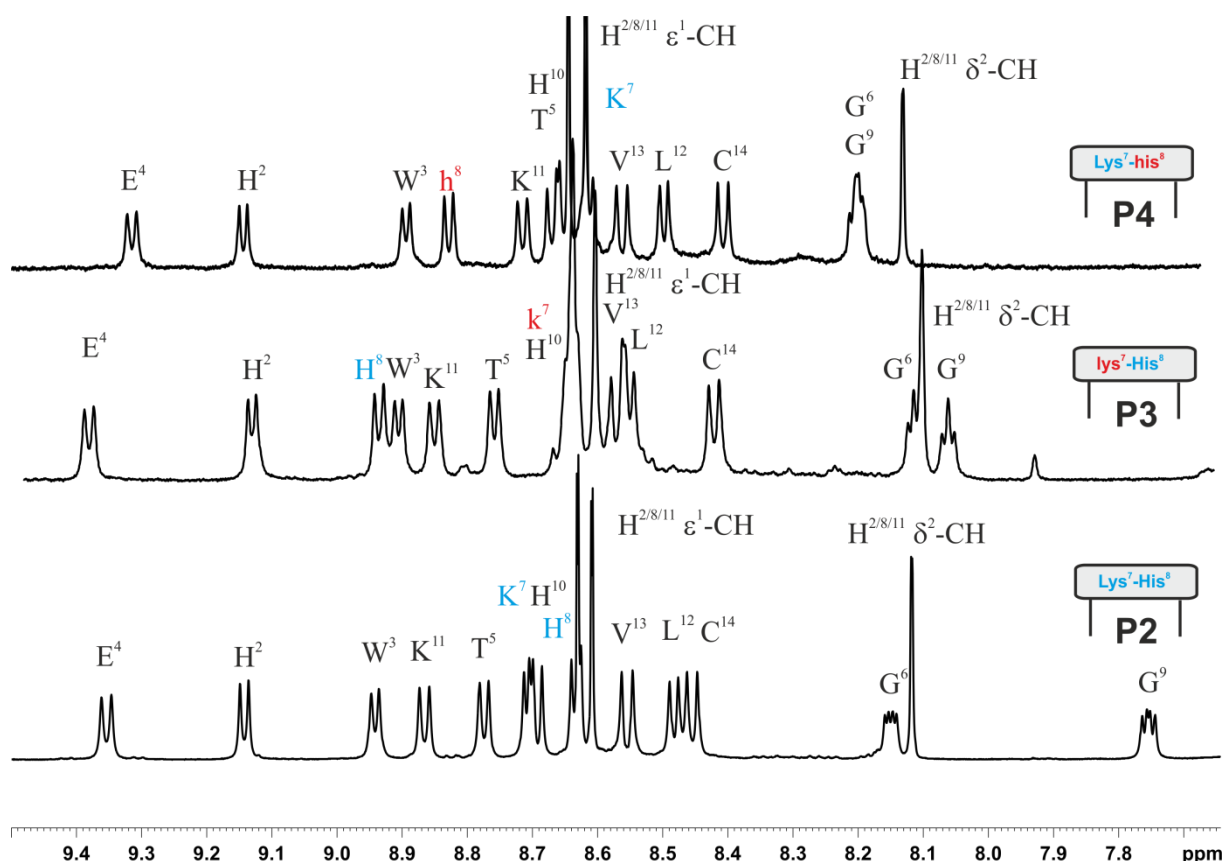


Abbildung 4-15: Amidbereiche der ¹H-NMR Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) der Peptide **P2**, **P3** und **P4**. **P3** und **P4** weisen dabei jeweils eine D-Aminosäure im *turn* auf. Bei **P2** handelt es sich um die L-L-Variante. Die Signale der *turn*-Aminosäuren Lys⁷ und His⁸ sind je nach ihrer Konfiguration rot bzw. blau hervorgehoben. Auffällig ist die deutliche Änderung in der Multiplizität, sowie der chemischen Verschiebung der beiden Glycine.

In Abbildung 4-15 wird deutlich, dass die Modifikation der *turn*-Aminosäuren keinerlei Einfluss auf die Ausbildung des hydrophoben Clusters hat. Die chemische Verschiebung von den amidischen Protonen der Cluster-Aminosäuren bleibt annähernd konstant, ebenso Hochfeld Leu¹² δ -CH₃, welche als Maß für die Bildung des Clusters genommen werden kann und zu einem späteren Zeitpunkt noch detailliert diskutiert wird, ändert sich minimal im Peptid **P3** von -0.27 ppm für **P2** und **P4** zu -0.22 ppm. Die chemischen Verschiebungen ändern sich jeweils für die im *turn* befindlichen Amidprotonen. Weiterhin ist auffällig, dass sich die chemische Verschiebung beider Glycine maßgeblich verändert. Besonders beide amidische Protonen, welche sich in einer Wasserstoffbrücke befinden, was mit der Schirmung des Protons und der damit einhergehenden Hochfeldverschiebung einhergeht, erfahren im Zuge der D-Aminosäure-Mutationen eine deutlich Tieffeldverschiebung. Die diastereotopie Aufspaltung der Gly- α -Protonen geht in den Peptiden **P3** und **P4** verloren, was in den Ausschnitten der TOCSY-Spektren in Abbildung 4-16 gezeigt ist.

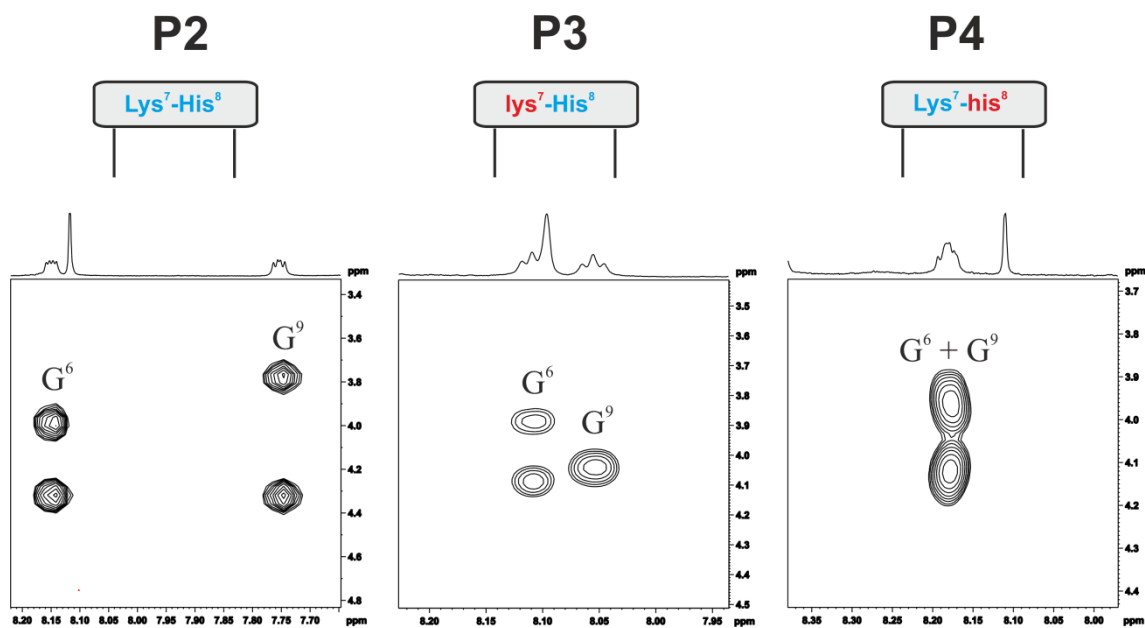


Abbildung 4-16: Ausschnitt der TOCSY-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) der Peptide **P2**, **P3** und **P4**: Die diastereotopie Aufspaltung der Gly⁹ α -Protonen verringert sich in beiden D-Aminosäure Mutanten.

Dies deutet darauf hin, dass die *turn*-Struktur in den beiden D-Aminosäure Peptiden **P2** und **P3** deutlich flexibler ist als in **P2**. Die Temperaturkoeffizienten für die Amidprotonen der Peptide **P2** und **P3** verhalten sich sehr ähnlich. Innerhalb des hydrophoben Clusters sind keine Änderungen zu vernehmen, doch auch die beiden Glycine zeigen, obwohl sie laut den NMR-

Spektren aus Abbildung 4-16 eine deutlich unterschiedliche Konformation aufweisen, keine Änderungen in den Temperaturkoeffizienten. Die Werte dieser Koeffizienten für Gly⁶ und Gly⁹ machen deutlich, dass sich beide Amidprotonen nachwievor in einer Wasserstoffbrücke befinden. Auch die Temperaturkoeffizienten der *turn*-Aminosäuren verhalten sich unauffällig.

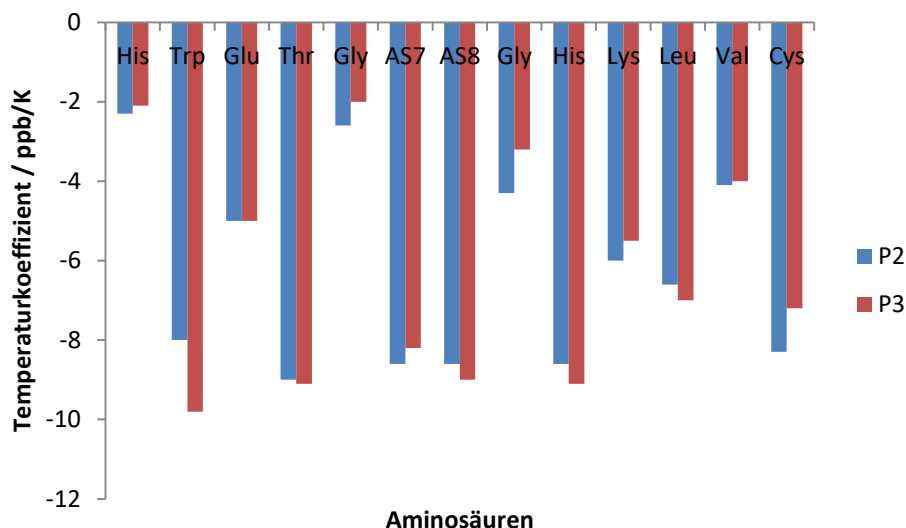


Abbildung 4-17: Temperaturkoeffizienten der Amidprotonen der Peptide **P2** und **P3**: Maßgebliche Änderungen sind nicht erkennbar.

Die beiden D-Aminosäure-haltigen Peptide **P3** und **P4** wurden hinsichtlich ihrer *interstrand* NOE-Kontakte analog zu Abbildung 4-7 analysiert. Alle drei Peptide zeigen das identische Muster in den Temperaturkoeffizienten (Abbildung 4-17). Auch innerhalb der *turn*-Region konnte nur der bereits zuvor beschriebene NOE-Kontakt zwischen AS⁸-NH (His⁸ bzw. his⁸) und Gly⁹-NH in allen Spektren verifiziert werden. Dies lässt wiederum den Rückschluss auf ein β I -oder β II'-*turn* zu. Es kann daher keine klare Aussage darüber getroffen werden, ob die Mutation zu einer D-Aminosäure in *i+1* und *i+2* Position die Struktur der *turn*-Region verändert. Die Änderung des Glycin-Musters lässt jedoch auf eine beweglichere *turn*-Struktur schließen. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu der allgemeinen Beobachtung, dass D-Aminosäuren in den Positionen *i+1* bzw. *i+2* *turn*-induzierende Eigenschaften aufweisen. Die Ausbildung des hydrophoben Cluster dieser Peptide mit D-Aminosäuren im *turn*-Bereich ist nahezu unabhängig von den hier gezeigten Mutationen. Lediglich das Gly-Gly-Motiv reagiert sensitiv auf diese Mutationen, weshalb nachfolgend die Faltungsparameter dieser Peptide anhand der *average chemical shift* Methode bestimmt werden.

4.3 Quantifizierungen der Faltungspopulation bei Mutation im *turn*-Bereich

Zur Vergleichbarkeit der Peptide, bei welchen Einzelmutationen im *turn*-Bereich durchgeführt wurden, kann die Faltungspopulation (FP) durch den *average chemical shift*-Wert (ACS) bestimmt werden. Im Gegensatz zur Quantifizierung mittels chemischer Verschiebung von $L^{12} \delta\text{-CH}_3$ oder der Amid-Dispersion, berücksichtigt diese Methode die chemische Verschiebung der α -Protonen. Diese Methode ist daher besonders dafür geeignet, dass sie im Falle der hier diskutierten Peptide auch die Beweglichkeit der Glycine berücksichtigt, indem das arithmetische Mittel beider α -Protonen berücksichtigt wird. Für 14 Aminosäuren-Peptide mit $n = 14$ (n : Gesamtzahl aller Aminosäuren) kann der ACS-Wert gemäß der folgenden Gleichung bestimmt werden.

$$FP = \frac{\sum_{n=1}^{n=14} \delta CH_{\alpha}^n - \sum_{n=6}^{n=9} \delta CH_{\alpha}^n}{n - 4} = \frac{\sum_{n=1}^{n=14} \delta CH_{\alpha}^n - \sum_{n=6}^{n=9} \delta CH_{\alpha}^n}{10}$$

Das Peptid mit dem höchsten ACS-Wert dient als 100% Referenz und alle anderen FP-Werte werden relativ zu diesem Wert bestimmt. Als 0% Referenz können dabei entweder *random coil*-Werte nach *Wishart* verwendet werden oder alternativ auch die beiden Fragmente des jeweiligen *hairpins*, bei welchen der Schnitt zwischen den Aminosäuren $i+1$ und $i+2$ gesetzt wird. Da die Referenzierung auf Fragmentwerte bei Punktmutationen entlang der Stränge jeweils die Synthese des entsprechenden Fragments erfordert, werden hier die tabellarischen *random-coil*-Werte von *Wishart* als Referenz gesetzt.^[155] Für die im vorhergehenden Kapitel beschriebenen D-Aminosäure-Mutationen der Peptide **P3** und **P4** wird im Vergleich zu **P2** und den *Wishart*-Werten als rc-Referenz eine quantitative Faltung von **P3** berechnet, während die D-His⁸-Mutation im Peptid **P4** die Faltungspopulation auf 74% reduziert. Diese Rechnung bestätigt die zuvor diskutierte Beobachtung, dass sich die Faltung bzw. die Bildung des hydrophoben Clusters nahezu unabhängig von den D-Aminosäure-Mutationen verhält, sondern lediglich das Gly-Gly-Motiv auf diese Änderungen reagiert.

4.4 Alanin-Mutationen des GKHG-Motivs

Eine prochirale Zuordnung der beiden α -Protonen von je Gly⁶ und Gly⁹ ist für die strukturelle Evaluation der Epitop-Region unerlässlich. Diese Zuordnung ist alleine aus den spektroskopischen Daten des Peptids **P2** nicht möglich, da das System formal unterbestimmt ist. Zudem Überlagern die Signale beider tieffeldigen α -Protonen von Gly⁶ und Gly⁹. Um zusätzliche Information über die lokale Struktur in einem nicht unterbestimmten System zu erhalten wurden die Aminosäuren Gly⁶ und Gly⁹ in die entsprechenden Alanin-Mutanten Ala⁶-Ala⁹ **P5**, ala⁶-ala⁹ **P6** und die gemischten Hybride Ala⁶-ala⁹ **P7** bzw. ala⁶-Ala⁹ **P8** überführt.

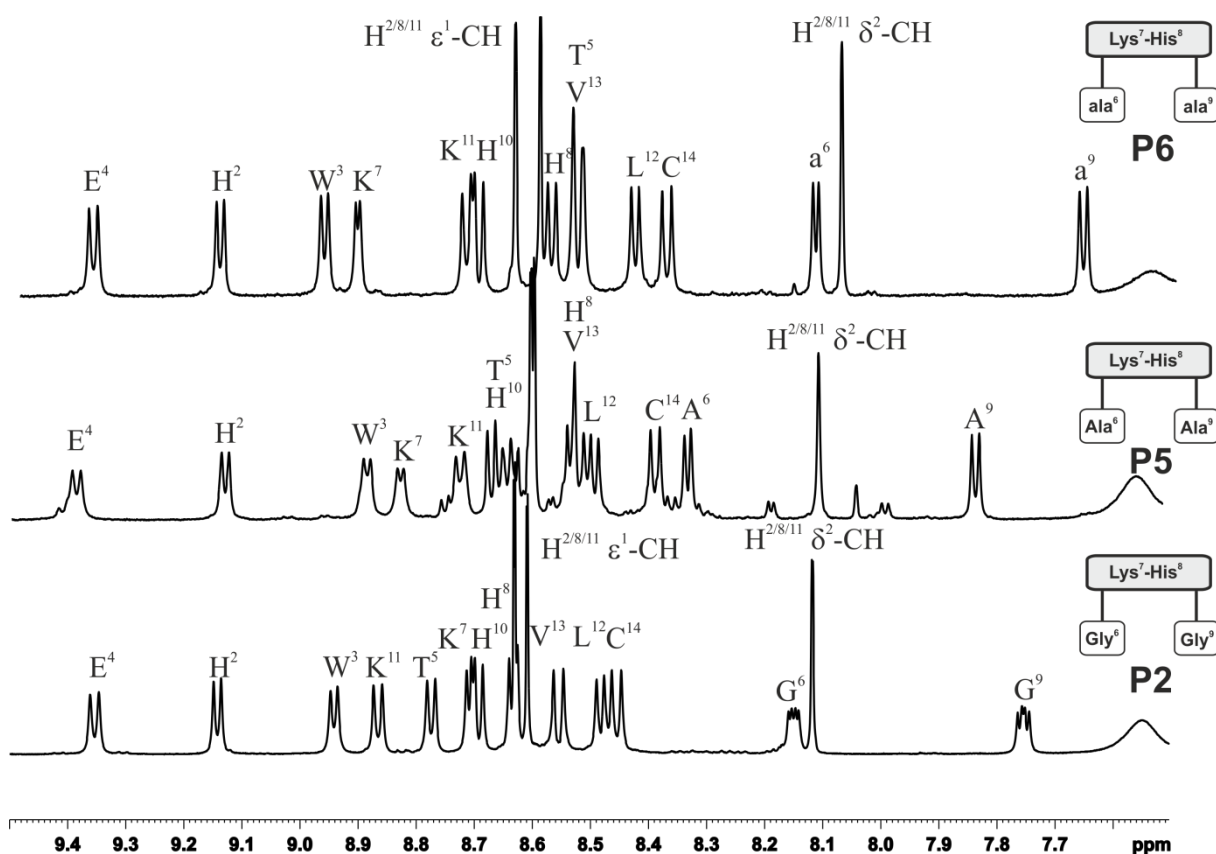


Abbildung 4-18: Amidbereich des ¹H-NMR Spektrums (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) der Peptide **P5** und **P6** im Vergleich mit der Gly-Gly-Variante **P2**. Auffällig hierbei ist, dass sich das Muster von A⁶-A⁹ in **P5** vom G⁶-G⁹-Motiv in **P2** unterscheidet, während sich aber **P2** und **P6** nahezu identisch sind.

Aus den Spektren in Abbildung 4-18 wird deutlich, dass das natürlich vorkommende G⁶-G⁹-Motiv in **P2** sich sehr gut durch die doppelten D-Alanin Mutationen in **P6** wiedergeben lässt. Die Ausbildung des hydrophoben Clusters verhält sich nahezu unabhängig von den durchgeführten Mutationen, was anhand der chemischen Verschiebungen von Leu¹² δ -CH₃ und den Signalen der Trp³-Seitenkette verifiziert werden kann. Nach Auswertung der

strukturelevanten NOE-Kontakte von **P6** kann ein Strukturvorschlag entwickelt werden, der in Abbildung 4-19 aufgezeigt ist.

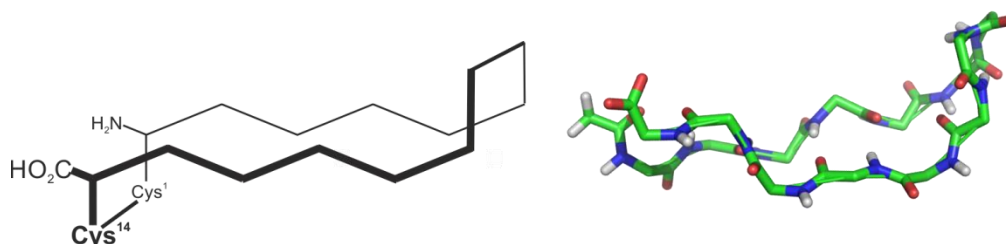


Abbildung 4-19: Auf Basis der NMR-Daten entwickeltes Strukturmodell für das Doppel D-Ala Peptid **P6** als Zick-Zack- (links) bzw. Stäbchenmodell (rechts).

Der entwickelte Strukturvorschlag zeigt ein Abknicken der *turn*-Region über- bzw. unterhalb der Rückgrat-Ebene. Diese Beobachtung ist kongruent mit zuvor in der Arbeitsgruppe Geyer durchgeführten, systematischen D-Aminosäure-Mutationen in β -hairpins.^[110] Wird die Population der gefalteten Spezies wie zuvor anhand der Tieffeldverschiebung von Leu¹² δ -CH₃ berechnet, so werden die in Abbildung 4-20 gezeigten Werte erhalten.

		Position 6		
		G	A	a
Position 9	G	100%* P2	8% P10	98% P12
	A	8% P9	96% P5	8% P8
	a	103% P11	98% P7	103% P6

Abbildung 4-20: Berechnete Faltungspopulationen der Alanin-Peptide, ausgehend von der Hochfeldverschiebung von Leu¹² δ -CH₃. Es ist auffällig, dass entweder immer eine quantitative Population oder nahezu gar keine Population in den Peptiden gefunden wird.

Aus den berechneten Werten für die Faltungspopulation wird deutlich, dass nur zwei Extremfälle auftreten, bei welchen die Peptide entweder komplett oder gar nicht gefaltet sind. Alle Peptide auf den Diagonalen (orange bzw. grün) besitzen in beiden Positionen die identisch konfigurierten Aminosäuren und zeigen eine quantitative Faltung. Die Symmetrie der Neben-Diagonalelemente wird durch das Paar **P7-P8** gebrochen. In allen gefalteten Peptiden können die *interstrand*-NOE Kontakte gemäß Abbildung 4-7 verifiziert werden. Auch die dazugehörigen Temperaturgradienten zeigen keine Auffälligkeiten. Nach Auswertung aller strukturelevanten NOE Kontakte gemäß Abbildung 4-8 können dreidimensionale Strukturen für die Peptide Gly⁶-ala⁹ **P9**, Gly⁶-Ala⁹ **P11** und Gly⁶-Gly⁹ **P2** erhalten werden (Abbildung 4-21). Hieraus wird deutlich, dass sich besonders **P11** unüblich verhält und einen α -helikalen *turn* ausbildet. **P2** und **P9** werden etwas gestreckte β I'-*turn* Strukturen gefunden. Aus den systematischen Alanin-Mutationen konnte also ein Strukturvorschlag für **P2** entwickelt werden, was von besonderer Bedeutung ist, da dieses Peptid zum späteren Zeitpunkt in den biologischen Studien eingesetzt wird.

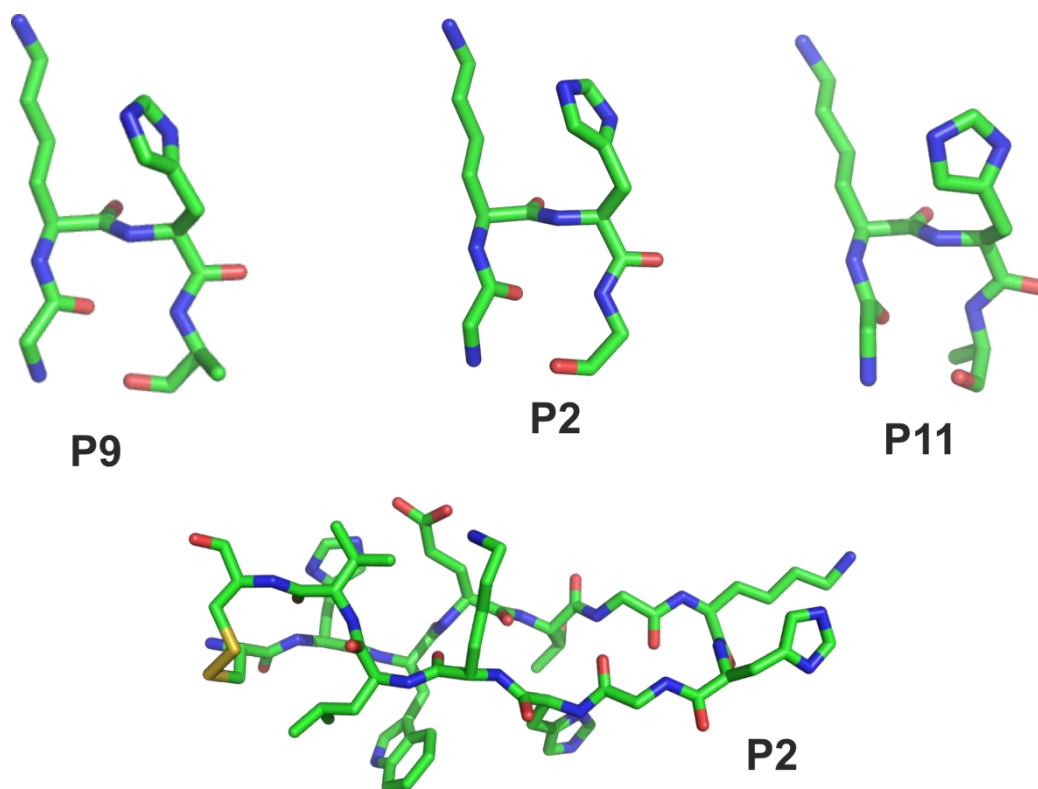


Abbildung 4-21: Auf Basis der NMR-Daten entwickelte Strukturvorschläge für den *turn*-Bereich der Peptide **P9**, **P11** und **P2**. Während **P9** und **P2** einen β I'-*turn* ausbilden, zeigt sich für **P11** ein α -*turn*. Der entwickelte Gesamtstruktur-Vorschlag für **P2** zeigt einen hydrophoben Cluster, welcher sich analog zu bisherigen Studien verhält.^[106,110] Im *turn*-Bereich zeigt sich eine leichte Streckung der Gesamtstruktur.

4.5 Thioamide im hairpin-Motiv

Die Thioamid-Bindung ist eine nahezu isostere Substitution der klassischen Amidbindung (Abbildung 4-22a).^[156] Die Modulation der klassischen Amidbindung zum Thioamid liefert eine erhöhte proteolytische Stabilität, was bereits in einigen biologisch aktiven Peptiden angewandt wurde.^[157,158] Die Modifikation von Thioamid-Bindungen im Rückgrat eines Peptids kann dazu genutzt werden, spezifische Wasserstoffbrücken-Bindungsmuster und ihr daraus resultierendes sekundäres Strukturmotiv zu untersuchen, da sich deren Bindungsverhalten durch die signifikant längere C=S-Bindung (CO: 1.23 Å, CS: 1.65 Å)^[159] deutlich unterscheidet (Abbildung 4-22b).

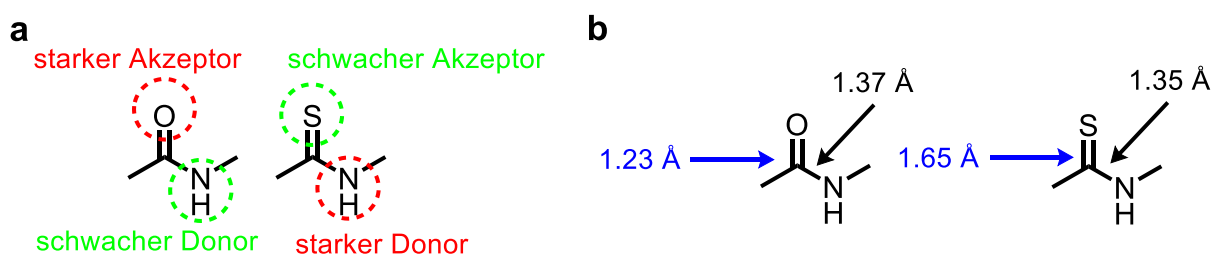
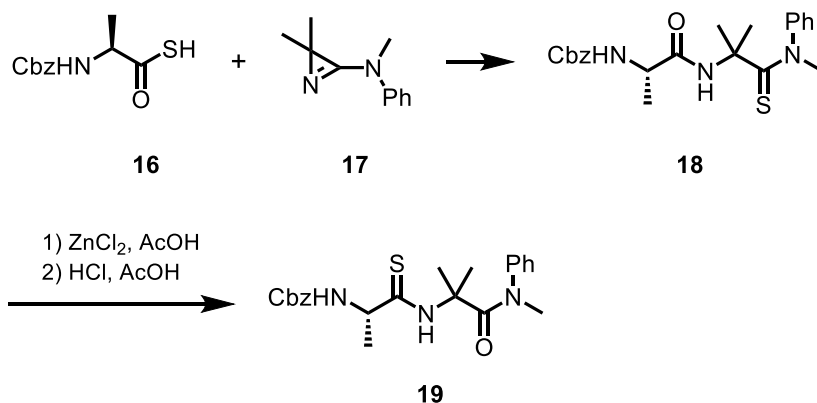
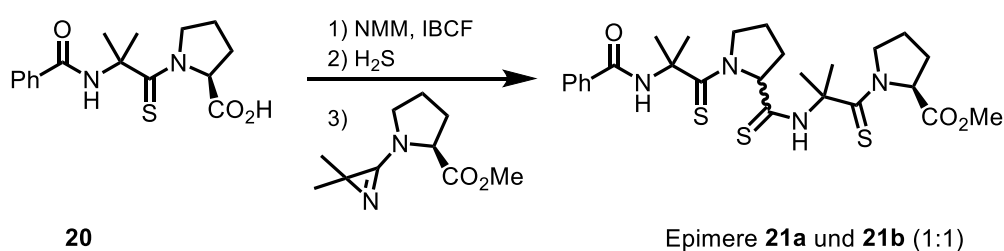
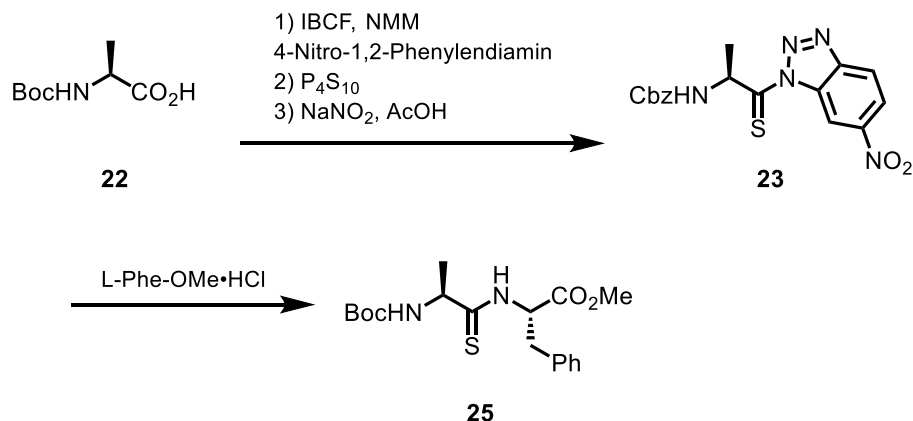


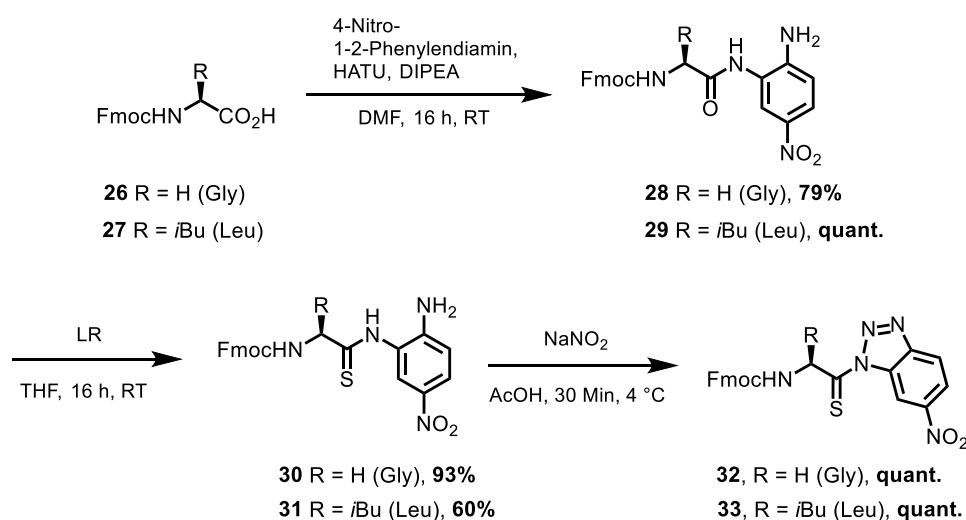
Abbildung 4-22: a: Thioamide und deren Verhalten in Wasserstoffbrücken-Bindungen. b: Bindungslängen im Thioamid-Strukturmotiv im Vergleich zum Amid.

Während ein Thioamid-NH Proton der stärkere Wasserstoff-Donor ist im Vergleich zum CONH, ist der Schwefel ein deutlich schwächerer H-Akzeptor im Vergleich zum Sauerstoff.^[160] Diese Beobachtung wurde zur Untersuchung von Thioamiden in α -Helices^[161] und β -hairpins^[162,163] verwendet, wobei in der Regel durch Einbau von Thioamiden in α -Helices diese aufgrund ihrer hohen Packungsdichte destabilisiert werden. In der Arbeit von Meyer et al.^[162], in welcher der Einfluss der Inkorporation von Thioamiden in β -hairpin Peptiden studiert wurde, wurden lediglich die Aminosäuren in den Positionen $i+2$ und $i+3$ zu ihren Thioamid-Analoga modifiziert. Die entsprechenden Amidprotonen in diesen Positionen sind für die vier möglichen Strukturmodelle eines klassischen β -hairpins mit antiparallelen Faltblättern nicht aktiv an der Ausbildung der Wasserstoffbrücken-Netzwerkes beteiligt, weshalb in der vorliegenden Arbeit erstmals der selektive Einfluss von Thioamiden in einer Wasserstoffbrücken-gebundenen Position bzw. nicht-gebundenen Position innerhalb der beiden Stränge untersucht werden sollte. Synthetisch ist die regioselektive Darstellung von Thioamid-haltigen Peptiden nach wie vor eine große Herausforderung. Bisherige Studien limitieren sich dabei größtenteils auf entweder den Einsatz eines Thionylierungs-Reagenzes,

Aziridin/Oxazol-Ansatz:**Thioacyl-Fluorobenzimidazolinone-Ansatz:****Benzotriazol-Ansatz:**

Schema 4-1: Im Azirin/Oxazol Ansatz wird Cbz-geschütztes Thio-L-Alanin **16** mit dem Azirin **17** zum Thioamid **18** umgesetzt, wobei die weitere Reaktion mit ZnCl_2 in AcOH eine Umlagerung des C-terminalen Thioamids zu **19** bewirkt. Der später entwickelte Thioacyl-Fluorobenzimidazolinon-Ansatz beginnt mit der Kupplung von 4-Fluoro-1,2-Phenyldiamin an eine N-terminal geschützte Aminosäure **20**. Anschließend erfolgt mit *Lawessons Reagenz* die Thionylierung, bevor mit Phosgen das Imidazolinon gebildet wird, welches dann als Aktivester mit einer C-terminal geschützten Aminosäure zum Thioamid-Dipeptid **21a-b** umgesetzt wird. Der Benzotriazolid-Ansatz verfolgt eine ähnliche Strategie: Hier erfolgt die Kupplung der N-terminal geschützten Aminosäure **22** an 4-Nitro-1,2-Phenyldiamin, das Aminoanilid wird anschließend thionyliert und mittels NaNO_2 in AcOH wird das Benzotriazoli **23** dargestellt, welches wiederum als Aktivester dient und mit einer C-terminal geschützten Aminosäure zum Thioamid-Dipeptid **24** umgesetzt wird. Weitergehend können mit Proteasen als Enzym Thioamid-haltige Peptide kettenverlängert werden.^[164]

wie beispielsweise Phosphorpentasulfid^[165] oder *Lawessons Reagenz*^[143,166–168], oder eines Thioacylierungs-Reagenzes. Beispiele für Thioacylierungs-Reagenzien sind Thiobenzotriazole^[169], Thioacyl-Fluorobenzimidazolinone^[170] und die Azirin/Oxazolone-Methode^[171]. Thionylierungs-Reagenzien benötigen oft den Einsatz von trockenen Lösungsmitteln und die Umsetzung eines Peptides, unabhängig ob an der Festphase oder in Lösung, mit Thionylierungsreagenzien liefert oft inseparable Produktmischungen. Der Einsatz von Thionylierungs-Reagenzien ist zusätzlich auf Aminosäuren ohne Seitenketten-Funktionalität beschränkt, weshalb Thioacylierungs-Reagenzien große Vorteile aufweisen. Bei Thioacylierungs-Reagenzien kann allerdings die Bildung des entsprechenden Oxo-Amids beobachtet werden.^[172] Auch die Epimerisierung bei der Bildung des Reagenzes unter basischen Bedingungen ist bekannt.^[173] Schema 4-1 fasst die Methoden zur regioselektiven Darstellung von Thioamiden zusammen. Basierend auf der Methode von *Rapoport et al.*^[169] wurde deren Konzept im Jahre 2015 von *Chatterjee et al.*^[159] weiterentwickelt, indem die Synthese entsprechender Benzotriazole auf α -Fmoc-geschützte Aminosäuren übertragen wurde. Zusätzlich konnte diese Synthese auch erstmals für alle proteinogenen Aminosäuren mit entsprechenden Seitenketten-Schutzgruppen angewandt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die entsprechenden Thio-Benzotriazole von Glycin **32** und L-Leucin **33** dargestellt, deren Synthese in Schema 4-2 gezeigt ist.



Schema 4-2: Synthese der Thio-Benzotriazole **32** und **33** nach einer modifizierten Vorschrift von *Chatterjee et al.*^[159]. Die Aktivester konnten in einer Gesamtausbeute von 79% für Glycin **32** und 60% für Leucin **33** über drei Stufen erhalten werden.

Die Umsetzung des Aminoanilids **28/29** mit *Lawessons Reagenz* zum entsprechenden Thioamid **30/31** erfolgt in akzeptablen Ausbeuten. Charakteristisch für die Bildung eines Thioamids ist die deutliche Tieffeldverschiebung des amidischen Protons zu ca 11.5 ppm im Vergleich zum Oxo-Amid Vorläufer **28/29**. Das ^1H -NMR Spektrum von Verbindung **31** ist in Abbildung 4-23 gezeigt.

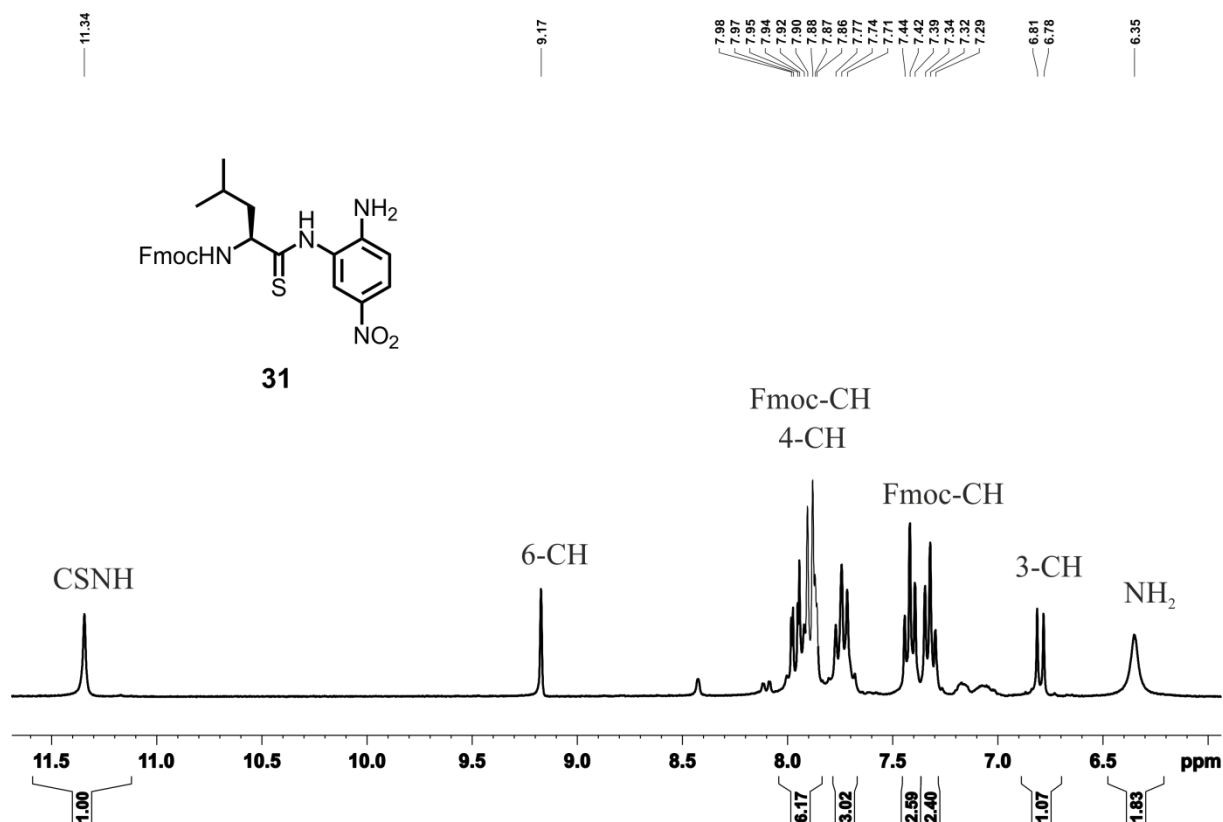
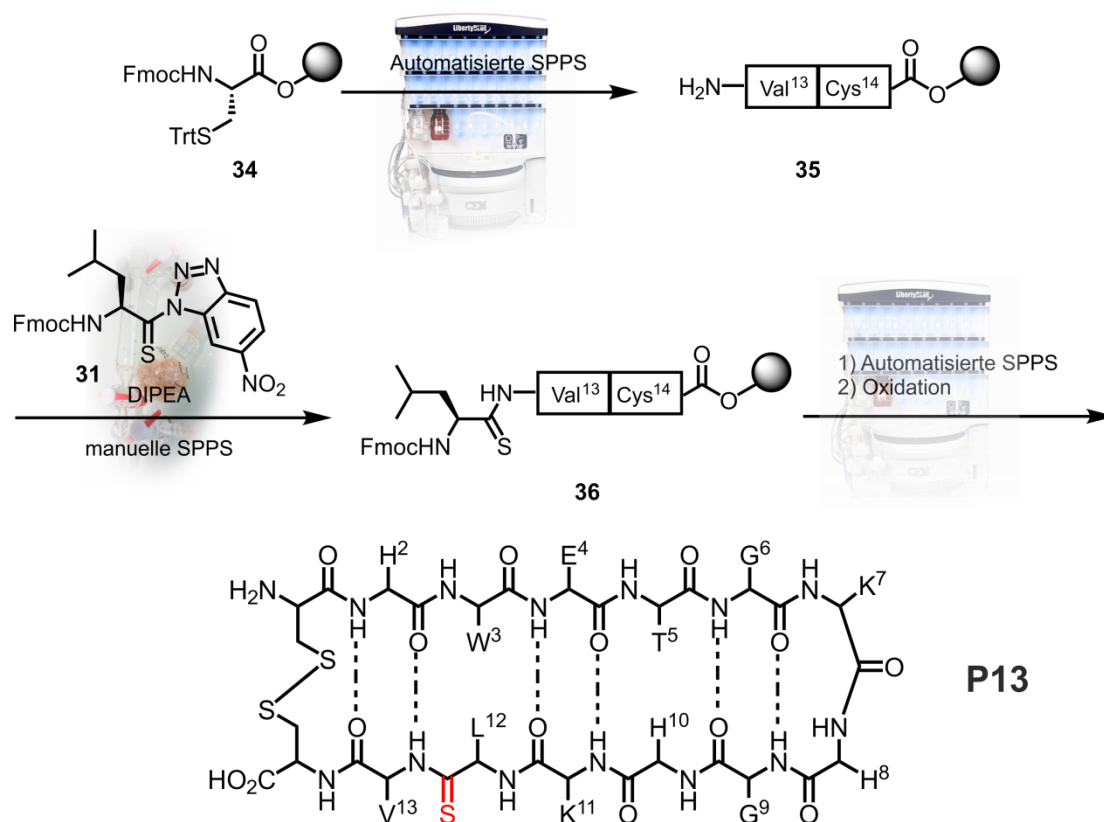


Abbildung 4-23: ^1H -NMR Spektrum (300 MHz, 300 K, DMSO-d_6) von Verbindung **31**: An der Tieffeldverschiebung des amidischen Protons ist die Umsetzung zum Thioamid eindeutig erkennbar.

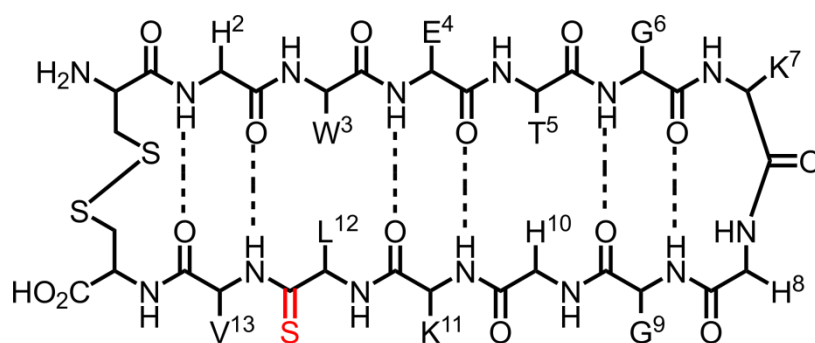
Erstmals wurde von *Chatterjee et al.*^[159] auch gezeigt, dass die dargestellten Thio-Benzotriazole auch unmittelbar in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden können. Dabei war keine weitere Zugabe eines Kupplungsreagenzes notwendig, lediglich DIPEA wurde als Base zur Reaktion hinzugegeben. Über die Mikrowellen-Einsatzbarkeit dieser Bausteine wurde nicht berichtet, weshalb an dieser Stelle eine Kombination aus automatisierter und manueller Festphasenpeptidsynthese angewandt wurde. Diese Methodik ist in Schema 4-3 aufgezeigt. Hierbei wird zunächst die gewünschte Peptidsequenz in einer automatisierten Synthese bis zur Fmoc-entschützten Aminosäure synthetisiert, auf welche das entsprechende Thio-Benzotriazolid **32/33** gekuppelt werden soll. Der polymere Träger wird aus dem Synthesizer entfernt und in einer Glasfritte mit fünf Äquivalenten des Triazolids und zehn Äquivalenten DIPEA in DCM für eine Stunde versetzt. Die Rückführung des Harzes in

den Synthesizer ermöglicht dann die Fertigstellung der Sequenz. Abspaltung vom Harz, Oxidation und Aufreinigung erfolgen analog zu den zuvor dargestellten Methoden.

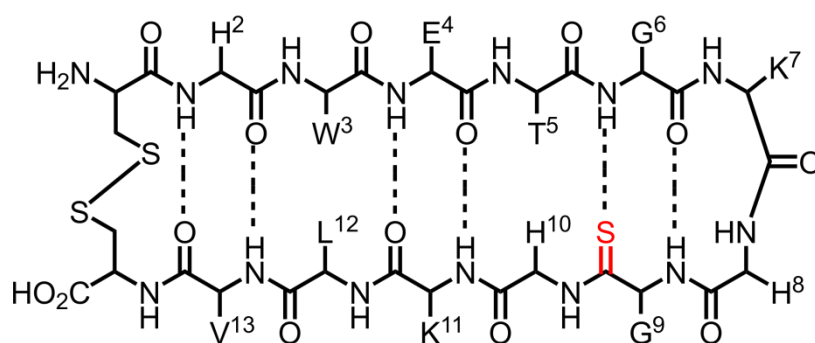


Schema 4-3: Schematische Darstellung zur Synthese der Thioamid-haltigen Peptide: Zunächst wird die Peptidsequenz bis zur entsprechenden Thio-Aminosäure-Position **35** in der automatisierten Peptidsynthese dargestellt. Das Harz wird anschließend aus dem Synthesizer genommen und in einer Glasfritte wird das entsprechende Thioamid durch die manuelle Umsetzung des peptidischen *N*-Terminus mit dem entsprechenden Thio-Benzotriazolid-Baustein **31** erhalten. Durch Rückführung des polymeren Trägers **36** in den Synthesizer wird die gewünschte Peptidsequenz fertiggestellt. Abspaltung vom Harz, Intramolekulare Disulfid-Oxidation und anschließende Aufreinigung liefert schließlich das entsprechende Thioamid-Peptid **P13**.

Dargestellt über diese Methode wurden Mutanten, in welchen jeweils Leu¹² und Gly⁹ zum entsprechenden Thioamid modifiziert wurden. Die Strukturen dieser Peptide, sowie deren Nomenklatur nach IUPAC sind in Abbildung 4-24 gezeigt.



[dsb^{1,14}]H-CHWETGKHHGKLV[CSNH]VC-OH **P13**



[dsb^{1,14}]H-CHWETGKHGV[CSNH]HKLVC-OH **P14**

Abbildung 4-24: Schematische Darstellung der beiden synthetisierten Thioamid-Peptide **P13** und **P14**: Gemäß IUPAC wird zur Nomenklatur dieser Peptide die sogenannte „Pseudo-Amid“-Schreibweise verwendet, dabei bezieht sich der Term Xaaψ[CSNH] auf die jeweilige unmittelbar zuvor genannte Aminosäure, die entsprechend als Thioamid in der Struktur verbaut ist.

Der erfolgreiche Einbau der gewünschten Thioamide mittels der Benzotriazolid-Methode nach *Chatterjee et al.*^[159] kann mittels Massenspektrometrie, als auch NMR-spektroskopisch eindeutig nachgewiesen werden. Charakteristisch in der NMR-Spektroskopie für die entsprechenden thionylierten Amidprotonen ist neben der starken Tieffeldverschiebung auch die beschleunigte Austauschrate, sodass die Thioamid-Signale erst unterhalb von Raumtemperatur im Protonenspektrum sichtbar werden. Der Amidbereich des ¹H-NMR-Spektrums des Peptids **P13** ist in Abbildung 4-25 gezeigt.

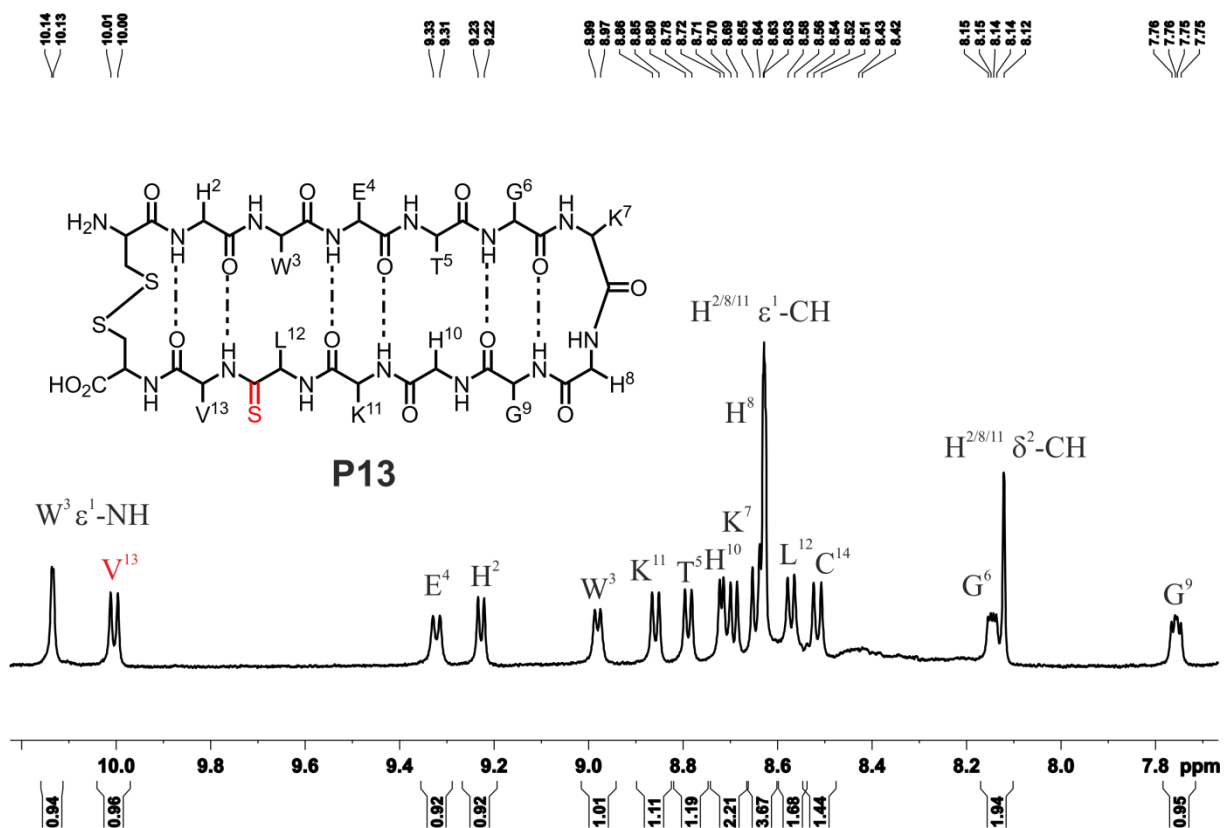


Abbildung 4-25: Amidbereich des ^1H -NMR-Spektrums (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) des Thioamid-Peptids **P14**: Die deutliche V¹³-NH Tieffeldverschiebung bestätigt den Einbau des L¹² Thioamids.

Das Spektrum in Abbildung 4-25 verdeutlicht, dass das gewünschte Thioamid-Peptid **P13** erfolgreich dargestellt werden konnte. Durch die Tieffeldverschiebung des Val¹³-NH wird dies deutlich. Die Amid-Dispersion sowie die Dispersion der beiden Glycin-Amide sind im Vergleich zum Oxo-Peptid **P2** nahezu unverändert. Auch die chemische Verschiebung des Tieffeld-Leu¹²- δ -CH₃, welche bereits zuvor als Hinweis auf die Faltungspopulation genutzt wurde, erfährt keine Änderung, weshalb von einer nahezu identischen Faltungspopulation ausgegangen werden kann. Die Seitenkette von Trp³ zeigt auch das typische Aufspaltungsmuster bei erfolgreicher Ausbildung des hydrophoben Clusters. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass das Thiocarbonyl des Leu¹² nach außen hin orientiert ist und nicht aktiv in das Netzwerk der Wasserstoffbrücken eingreifen kann. Val¹³-NH zeigt im Zuge dieser Mutation einen leicht erhöhten Temperaturgradienten von ca. -6 ppb/K (-4.1 ppb/K im Oxo-Peptid **P2**). Die Einführung des Thioamids innerhalb des hydrophoben Clusters in einer nicht wasserstoffbrücken-gebundenen Position hat daher in diesem Fall keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung der Sekundärstruktur des Peptids. Dies entspricht auch den Erwartungen durch die veränderten Donor/Akzeptor-

Bedingungen gemäß Abbildung 4-26. Der hydrophobe Cluster als stabilisierendes Design-Element überkompensiert hier die Thioamid-Substitution.

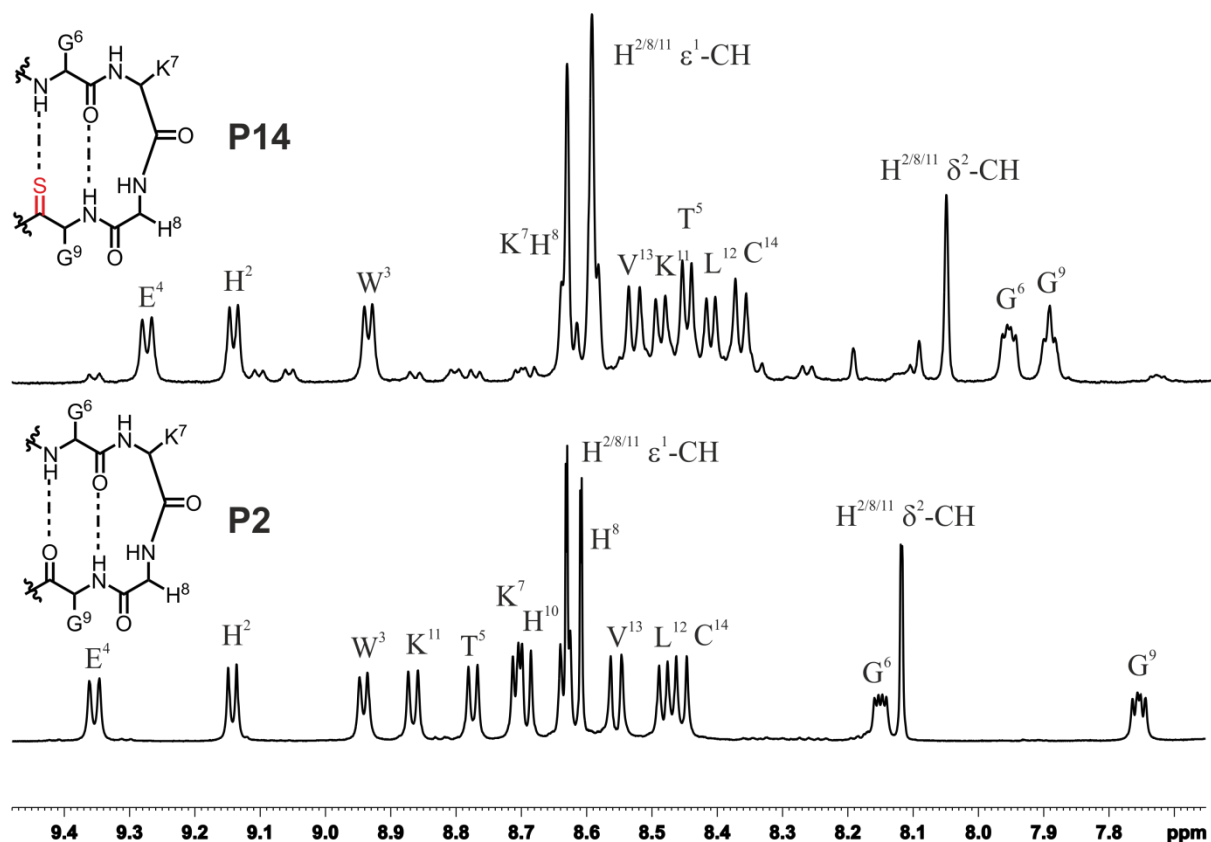


Abbildung 4-26: Amidbereich des ^1H -NMR-Spektrums (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/ D_2O 9:1, pH 3.0) des Thio-Gly 9 -Peptids **P14** im Vergleich zum Oxo-Peptid **P2**: Es ist eine deutliche Verringerung der amidischen Dispersion erkennbar. Auch die Veränderungen innerhalb der Seitenketten des hydrophoben Clusters verweisen auf eine globale Veränderung der Peptidstruktur.

In Abbildung 4-26 ist der Amidbereich des entsprechenden $\text{G}^9\psi[\text{CSNH}]$ Peptids **P14** gezeigt. Im Unterschied zum zuvor diskutierten $\text{L}^{12}\psi[\text{CSNH}]$ Peptid **P13**, in welchem das generierte Thioamid keinen Einfluss auf das Wasserstoffbrücken-Netzwerk hat, ist in diesem Peptid die Mutation in einer Wasserstoffbrücken-gebundenen Position erfolgt. Weiterhin muss bei dieser Betrachtung berücksichtigt werden, dass die Thioamid-Substitution im Peptid **P14** nicht im hydrophoben Cluster, sondern in einer Position des eif5a-loops erfolgt.

Die Dispersion der Amidprotonen, aber besonders die Dispersion der beiden Glycin-Amide ist deutlich reduziert im Vergleich zum entsprechenden Vorgängerpeptid **P2**. $\text{Leu}^{12}\text{-}\delta\text{-CH}_3$ erfährt im Zuge dieser Mutationen eine unwesentliche Hochfeldverschiebung, was auf eine geringfügig reduzierte Faltungspopulation hindeutet. Wird hier $\text{Leu}^{12}\text{-}\delta\text{-CH}_3$ als Indiz für die Faltungspopulation genutzt und **P2** als quantitativer Faltungsstandard gesetzt, so reduziert sich im Zuge der Thioglycin-Modifikation die Faltungspopulation unwesentlich auf 97%.

His¹⁰-NH ist durch die beschleunigte Austauschrate des Thioamids bei Raumtemperatur nicht sichtbar, das Signal wird erst bei 280 K ersichtlich. Temperaturabhängige ¹H-NMR-Spektren dieses Peptids sind in Abbildung 4-27 gezeigt.

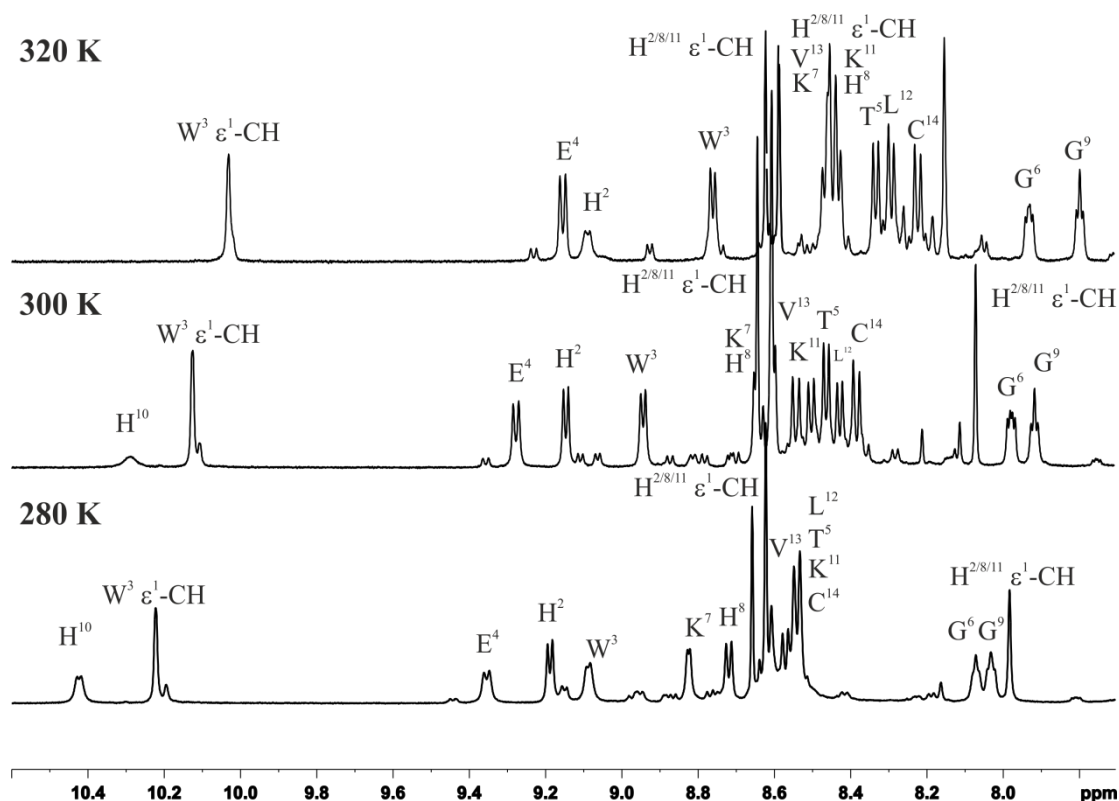


Abbildung 4-27: Amidbereich des ¹H-NMR-Spektrums (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) des Thio-Gly⁹-Peptids **P14** bei 280, 300 und 320 K: Erst bei 280 K wird das amidische Proton von His¹⁰ sichtbar. Auch die Dispersion der Glycine wird bei steigender Temperatur deutlich größer.

Eine signifikante Änderung in den Temperaturkoeffizienten ist nicht erkennbar (Abbildung 4-28). Auch hier überkompensiert der stabilisierende Effekt des hydrophoben Clusters die lokale Variation des Wasserstoffbrücken-Musters.

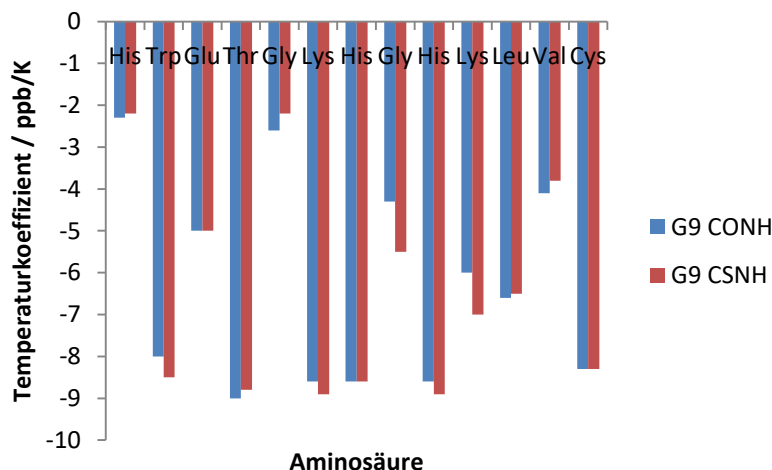


Abbildung 4-28: Temperaturgradienten der Amidprotonen des $G^9\psi$ [CSNH]-Peptids **P14** im Vergleich mit dem entsprechenden Oxo-Peptid **P2**. Eine Erhöhung des Gradienten ist vor allem für G^6 -NH zu beobachten, welches dem Thiocarbonyl von Gly^9 gegenüber liegt und damit eine Wasserstoffbrücke eingeht.

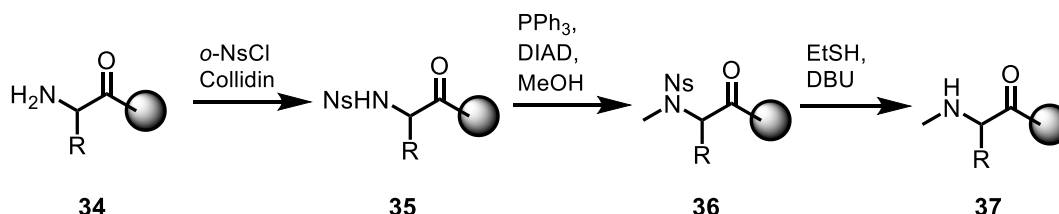
Aus beiden punktuellen Mutationen der Amide zu den entsprechenden Thioamiden kann geschlossen werden, dass in dem gewählten Modellsystem die Mutation zum Thioamid in einer nicht im Wasserstoffbrücken-Netzwerk involvierten Position keinen globalen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Peptids **P13** hat. Da diese Mutation innerhalb des hydrophoben Clusters erfolgt, kann davon ausgegangen werden, dass sich diese Mutation in den weiteren, nicht-bindenden Amid Positionen analog verhalten wird. Ähnlich hierzu verhält sich das $G^9\psi$ [CSNH] Peptid **P14**, bei dem die Mutation aktiv in das Netzwerk der Wasserstoffbrücken eingreift. Diese Mutation erfolgt außerhalb des Clusters, also innerhalb des *eif5a-loops*. Ausstehend sind hierbei jeweils der Einbau eines Thioamids in einer wasserstoffbrücken-gebundenen Position innerhalb des hydrophoben Clusters, sowie eine Thioamid-Substitution in einer nicht-gebundenen Position innerhalb des *loops*. Für zukünftige Untersuchungen des Einflusses der regioselektiven Thionylierung von Amiden in β -hairpin Peptiden könnte eine mehrfache Thionylierung innerhalb des Wasserstoffbrücken-Netzwerks erfolgen. Auch sollte der Einsatz unter automatisierten Mikrowellen-Bedingungen der entsprechenden Fmoc-Thio-Benzotriazole untersucht werden, da dies den Zeitaufwand der Synthese erheblich reduzieren würde. Eine weitere Möglichkeit aktiv in das Bindungsmuster von Wasserstoffbrücken einzugreifen ist der Einsatz von *N*-methylierten Aminosäuren, über deren Einsatz nachfolgend berichtet wird.

4.6 N-Methylierung im hairpin-Motiv

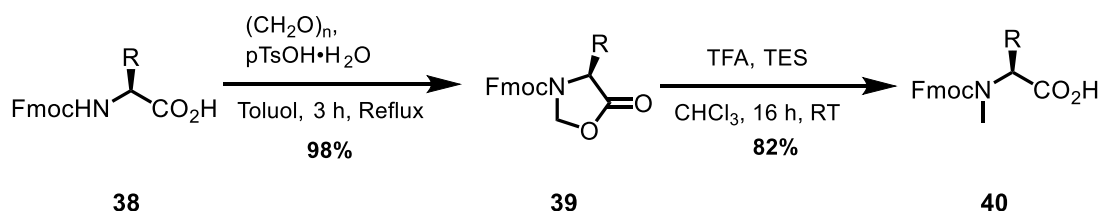
Zur Darstellung von N-methylierten Amid in Peptiden sind generell zwei Reaktionsprinzipien bekannt, die in Schema 4-4 dargestellt sind. In der von Kessler *et al.* beschriebene Methode wird zunächst die Peptidsequenz unter Standardbedingungen bis zum Fmoc-entschützten Amin, welches methyliert werden soll, synthetisiert.^[174] Anschließend wird dieses freie Amin mit *o*-NsCl versetzt, um das Amin nukleophil für eine *Mitsunobu-Reaktion* zu aktivieren.^[174,175] Die *Mitsunobu*-Reaktion erfolgt unter gewöhnlichen Bedingungen mit Methanol oder Methyljodid als Methylierungsreagenz.^[174,176] Die anschließende Entschützung des alkylierten Amins erfolgt in einer nukleophilen aromatischen Substitution mit Ethanthiol und DBU als Base. Es wird das methylierte, sekundäre Amin erhalten, welches daraufhin acyliert werden kann. Vorteil dieser Methode ist, dass gewöhnliche, kommerziell erhältliche Fmoc-Derivate der proteinogenen Aminosäuren zum Einsatz kommen, es ist also keinerlei Synthese in Lösung zuvor erforderlich. Nachteilig ist dabei, dass die *Mitsunobu*-Reaktion am polymeren Träger nicht immer vollständigen Umsatz liefert, was bei Synthesen von Peptiden mit mehreren N-methylierten Aminosäuren problematisch wird. Auch die Entschützung des nosylierten α -Amins unter stark basischen Bedingungen kann außerdem zur Epimerisierung des Stereozentrums führen.^[177,178] In der zweiten bekannten Methode wird die entsprechende N-methylierte, Fmoc-geschützte Aminosäure zunächst in Lösung dargestellt, bevor diese in der Peptidsynthese eingesetzt wird. Die Synthese erfolgt dabei ausgehend von der entsprechenden α -Fmoc-geschützten Aminosäure, welche zunächst durch säurekatalysierte Umsetzung mit Paraformaldehyd in das 5-Oxazolidinon überführt wird. Dieses wird anschließend reduktiv unter sauren Bedingungen mit Trifluoressigsäure und Triethylsilan geöffnet, sodass daraus die Fmoc-geschützte N-methylierte Aminosäure resultiert, welche unmittelbar in der automatisierten Peptidsynthese eingesetzt werden kann.^[179,180] Problematisch wird diese Route dann, wenn die N-methylierten Derivate von Aminosäuren dargestellt werden sollen, welche säurelabile Schutzgruppen in der Seitenkette tragen. Für Asn und Gln mit einer Trityl-Schutzgruppe in der Seitenkette kann diese Methode erfolgreich angewendet werden. Hydroxy-Aminosäuren müssen temporär Acetyl-geschützt werden, für Histidin eignet sich die Dinitrophenyl-Schützung und für Cystein wurde der entsprechende Benzyl-Thioether erfolgreich in die Fmoc-geschützte, N-methylierte Aminosäure überführt. Alle weiteren N-methylierten Derivate der proteinogenen Aminosäuren, welche eine säurelabile Seitenketten-Schutzgruppe tragen, müssen bei dieser Route ausgehend von entsprechenden Precursoren, wie beispielsweise

Glutaminol, oder Aspartinol synthetisiert werden, was ein großer Nachteil dieser Methodik ist. Für alle weiteren seitenketten-ungeschützten Aminosäuren kann diese Methode problemlos angewandt werden. In der Regel wird die entsprechend *N*-methylierte Aminosäure in ca. 80% Ausbeute über beide Stufen erhalten.^[179,180]

1. Methylierung an der festen Phase



2. Synthese der Fmoc-geschützten, *N*-methylierten Aminosäure:



Schema 4-4: Synthetische Strategien zur Darstellung *N*-methylierter Peptide: Nach Kessler *et al.* kann die Methylierung an der festen Phase erfolgen, indem eine Peptidsequenz bis zur gewünschten Methylierungsposition **34** synthetisiert wird. Anschließend wird das entsprechende Amin zu **35** nosyliert, in einer *Mitsunobu*-Reaktion methyliert **36** und entschützt **37**. Die alternative Darstellungsweise ist die Synthese der Fmoc-geschützten *N*-methylierten Aminosäure über die 5-Oxazolidinon-Methode. Hierbei ist man bei den proteinogenen Aminosäuren auf den Einsatz von Aminosäuren ohne säurelabile Schutzgruppen in der Seitenkette angewiesen. Die entsprechend Fmoc-geschützte Aminosäure **38** wird zunächst in das 5-Oxazolidinon **39** überführt, bevor dieses sauer reaktiv zur Fmoc-geschützten *N*-methyl Aminosäure **40** gespalten wird.

Der erhöhte sterische Anspruch von monomethylierten Aminen gegenüber den nicht alkylierten Analogen, sowie die etwas erhöhte Basizität führen zu einer geringeren Reaktivität in Acylierungsreaktionen.^[181,182] Unter Standard-Kupplungsbedingungen wird daher in der Regel für die Acylierung einer *N*-methylierten Aminosäure kein vollständiger Umsatz beobachtet, was den Einsatz von reaktiveren Kupplungsreagenzien notwendig macht. Neben den klassischen Onium-Salz-basierenden Reagenzien^[183] wurden Halogenpyrrolidino-phosphonium-Hexafluorophosphate (PyBroP/PyCloP)^[184], Phosgen^[177,185] und auch Tetramethylfluoroamidinium-Hexafluorophosphat (TFFH)^[186] als effektive Kupplungsreagenzien für *N*-methylierter Peptide beschrieben. Aktuelle Literatur beschreibt den Einsatz von Mikrowellenstrahlung in der Synthese *N*-methylierter Peptide in Abhängigkeit der

jeweiligen Peptidsequenz, sodass je nach dem gewählten Programm für die Mikrowellenstrahlung sehr gute Umsätze für die Darstellung der *N*-methylierten Peptide erhalten werden können.^[187]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei *N*-methylierte Peptide als Mutation des β -hairpin Peptids **P2** dargestellt. Da die beiden korrelierten Glycine in *i* und *i*+3 ein besonderes Merkmal dieser Struktur sind, wurde in den beiden dargestellten Peptiden **P15** und **P16** einmal ausschließlich Gly⁹ und einmal beide Positionen zum Sarkosin (Sar, *N*-Methyl-Gly) mutiert. Die *N*-Methylierung betrifft daher in beiden Peptiden unmittelbar eine Wasserstoffbrückenbindung. Die Synthese dieser Peptide erfolgte durch den Einsatz von Fmoc-Sar-OH **40** in der automatisierten Peptidsynthese. Fmoc-Sar-OH **40** wurde über die 5-Oxazolidinon-Methode nach Aurelio *et. al.* synthetisiert.^[180] Die beiden Sequenzen der dargestellten *N*-methylierten Peptide sind in Abbildung 4-29 gezeigt.

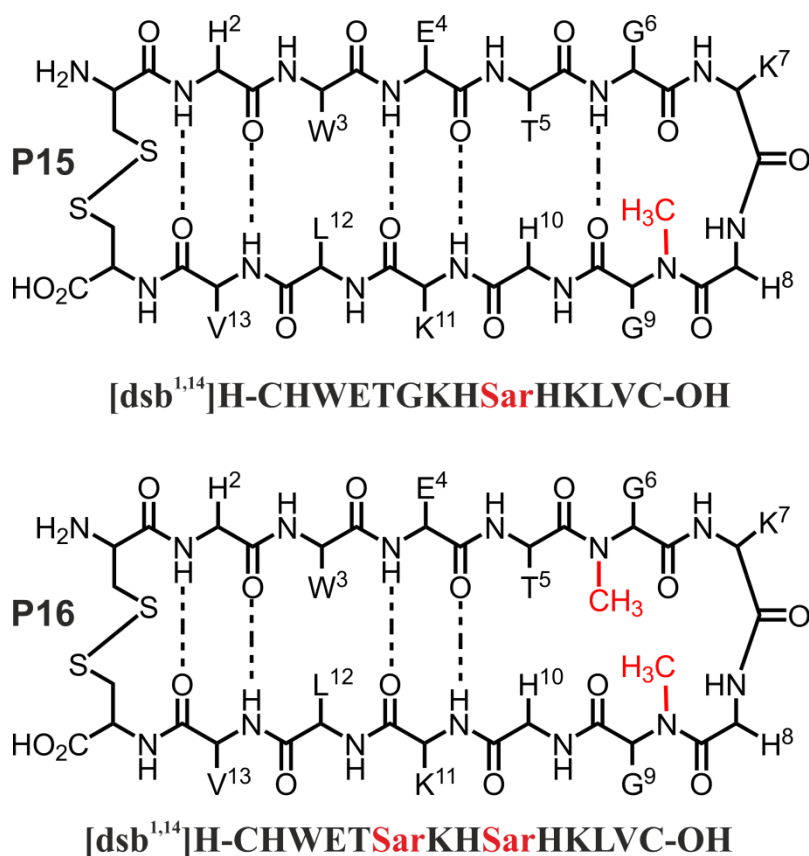


Abbildung 4-29: Struktur der dargestellten, *N*-methylierten Peptide **P15** und **P16**: Durch die *N*-Methylierung einer wasserstoffbrücken-gebundenen Position wird aktiv in das vorliegende Netzwerk aus Wasserstoffbrücken von β -hairpin Peptiden eingegriffen.

Die Sequenzierung von *N*-methylierten β -hairpin Peptiden kann, falls sich die Methylgruppe in einer identischen Position im Vergleich zum Amidproton in der nicht-methylierten Struktur befindet, nahezu analog zum *sequential walk* erfolgen. Der NOE-Kontakt zwischen His⁸- α -CH zur Methylgruppe von Sar⁹ entspricht dabei dem sequenziellen Kontakt. Die weiteren NOE-Kreuzsignale von der Methylgruppe zum Sar⁹- α -CH₂ und dessen darauffolgender sequenzieller NOE zu His¹⁰-NH lassen die vollständige Sequenzierung von *N*-methylierten Peptiden zu (Abbildung 4-30).

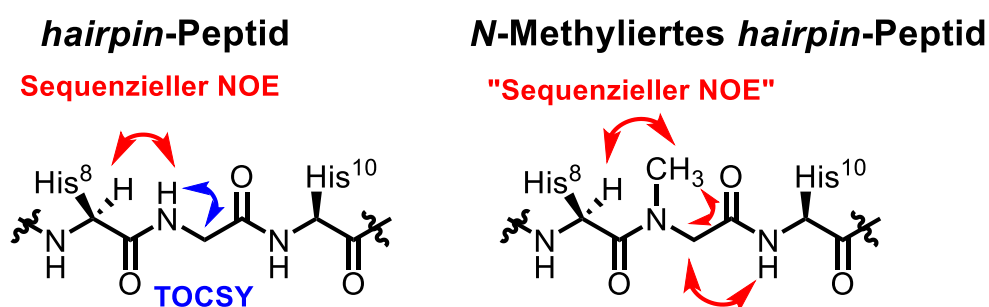


Abbildung 4-30: Befindet sich die Methylgruppe in einem β -hairpin-Peptid in einer räumlichen Orientierung, die der des Amidprotons in der entsprechenden nicht-methylierten Struktur entspricht, so kann der NOE-Kontakt vom α -Proton der davorliegenden Aminosäure zur Methylgruppe zur Sequenzierung genutzt werden. Da das Spinsystem der *N*-methylierten Aminosäure durch den tertiären Stickstoff unterbrochen wird, kann das entsprechende α -Proton über das NOESY-Spektrum identifiziert werden.

Eine weitere Herausforderung beider der strukturellen Charakterisierung von *N*-methylierten Peptiden ist die auftretende *cis/trans*-Isomerie des tertiären Amids, so gibt es potentiell 2ⁿ Konformere mit *n* methylierten Positionen.

Abbildung 4-31 zeigt den Amidbereich der ¹H-NMR-Spektren der beiden *N*-methylierten Peptide **P15** und **P16** im Vergleich mit dem nicht methylierten Analogon **P2**.

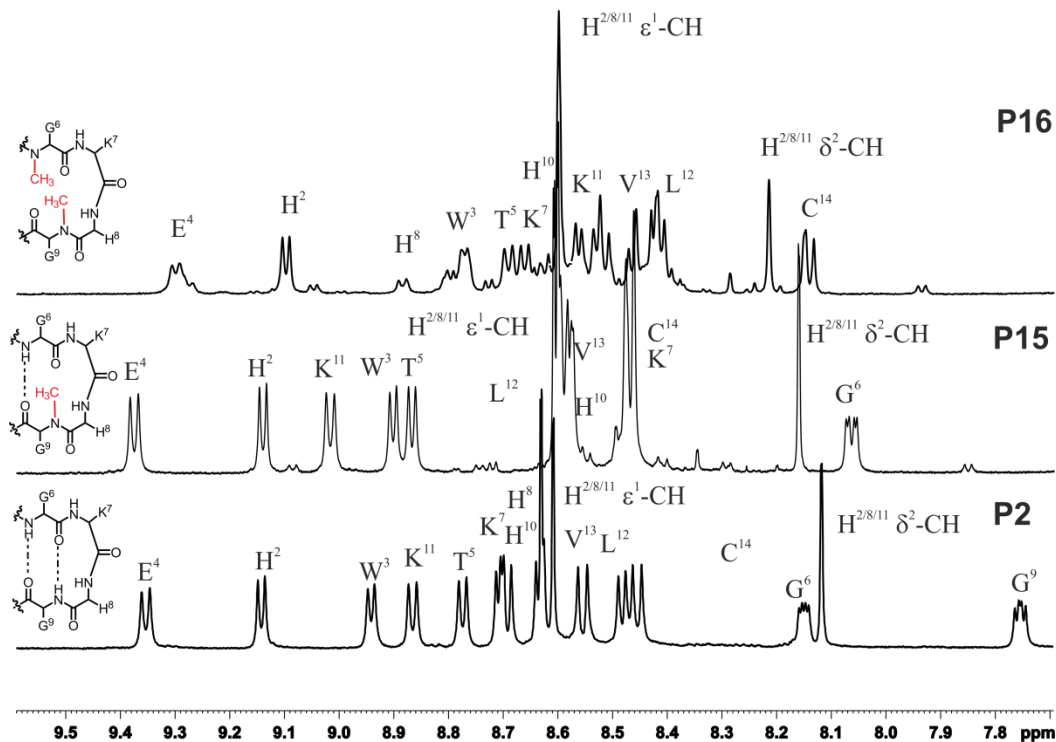


Abbildung 4-31: Amidbereich der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/ D_2O 9:1, pH 3.0) der beiden *N*-methylierten Peptide **P15** und **P16** im Vergleich mit **P2**. Während das monomethylierte Peptide **P15** zu 10% einen zweiten Signalsatz aufgrund der *cis/trans* Isomerie des tertiären Amids zeigt, werden im zweifach methylierten Peptide aufgrund der doppelten *cis/trans* Isomerie beider tertiäre Amide mehrere Signalsätze erhalten.

In Abbildung 4-31 wird deutlich, dass die einfache Methylierung von Gly⁹ von der Sekundärstruktur toleriert wird, während die doppelte Methylierung in den Positionen Gly⁶ und Gly⁹ die Faltungspopulation reduziert. Die Wasserstoffbrücken-Bindungen in diesen beiden Positionen befinden sich im eif5a-Anteil der designten Strukturen und sind damit entscheidend für die Ausbildung der Sekundärstruktur. Im Spektrum des doppelt methylierten Peptids **P16** werden mehrere Signalsätze deutlich, welche aus der Anwesenheit zweier tertiärer Amide resultieren. Die genaue Anzahl von vier theoretisch erwarteten Signalsätzen kann nicht eindeutig verifiziert werden. Die chemische Verschiebung von Leu¹² δ -CH₃ ist im Zuge der zweifachen Methylierung in **P16** mit -0.10 ppm im Vergleich zu -0.27 ppm in **P2** deutlich ins Tieffeld verschoben, was eine deutliche Reduktion der Faltungspopulation bestätigt. Im einfach methylierten Peptid **P15** liegt die chemische Verschiebung dieses Signals ebenfalls bei -0.27 ppm, was mit dem nicht-methylierten Peptid **P2** identisch ist. Für das zweifach methylierte Peptid wird anhand der Leu δ -CH₃ chemischer Verschiebung eine reduzierte Faltungspopulation von 83% erhalten. Das einfach methylierte Peptid **P15** zeigt zudem keine Auffälligkeiten in den Temperaturgradienten der amidischen Protonen im

Vergleich zum nicht-methylierten Peptid **P2**. Die Temperaturkoeffizienten dieser beiden Peptide sind in Abbildung 4-32 gezeigt.

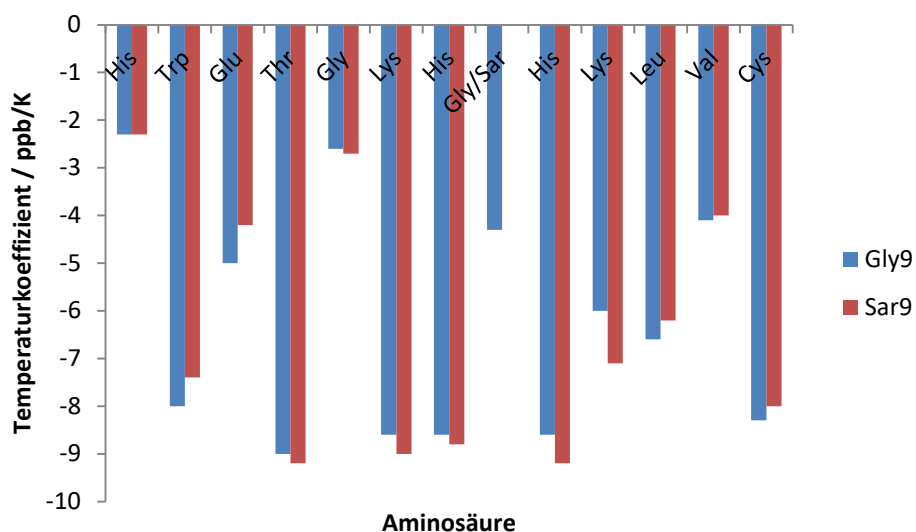


Abbildung 4-32: Temperaturgradienten der amidischen Protonen des Peptids **P16** im Vergleich mit dem monomethylierten Peptid **P15**: Es ist keine signifikante Änderung in den Temperaturgradienten erkennbar.

Aus den Daten der *N*-methylierten Peptide **P15** und **P16** konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass der hydrophobe Cluster in der Lage ist, selbst einen aktiven Eingriff in das Netzwerk aus Wasserstoffbrücken zu überkompensieren. Bei der Einführung zweier *N*-methylierter Aminosäuren hingegen wird die Faltungspopulation deutlich reduziert.

4.7 Variation des Anteils des hydrophoben Clusters

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Größe des hydrophoben Clusters bzw. welche Wechselwirkungen innerhalb des hydrophoben Clusters zur Stabilisierung der *loop*-Struktur notwendig sind, wurde eine Serie von Peptiden synthetisiert, bei welchen schrittweise der Anteil an Cluster-Aminosäuren reduziert wurde. Aufgrund der Tatsache, dass β -hairpin-Peptide immer alternierende Aminosäure-Paare in Wasserstoffbrücken-gebundenen bzw. nicht-Wasserstoffbrücken-gebundenen Positionen aufweisen, wurde diese Reduktion immer in Paaren von zwei Aminosäuren gegenüberliegend auf den β -Strängen vorgenommen. Tabelle 4-2 zeigt diese Sequenzen.^[188]

Tabelle 4-2: Sequenzen der Peptidserie dieser Studie und ihrem relative eif5a-*loop*-Anteil.

Peptid	Sequenz	Rel. Anteil eif5a
P17	[dsb ^{1,14}][dsb ^{5,10}]H-CHWECGKHGCKLVC-OH	29%
P2	[dsb ^{1,14}]H-CHWETGKHGHKLVC-OH	43%
P18	[dsb ^{1,14}]H-CHWKTGKHGHALVC-OH	57%
P19	[dsb ^{1,14}]H-CHSKTGKHGHAKVC-OH	71%
P20	[dsb ^{1,14}]H-CTSKTGKHGHAKCC-OH	86%
P1	H-STSKTGKHGHAKCH-OH	100%

Interessant im Vergleich zum bereits zuvor charakterisierten Monodisulfid-Peptid **P2** ist die Struktur von Bidisulfid-Peptids **P17**. Bei diesem Peptid wurde unmittelbar vor der *turn*-Region ein weiteres Disulfid durch den Einbau zweier Cysteine installiert, was die Frage aufwirft, inwiefern diese zusätzliche Restriktion die Struktur des Peptids zusätzlich stabilisiert. In Abbildung 4-33 sind Ausschnitte der Amidbereiche der ¹H-NMR-Spektren dieser beiden Peptide gezeigt. Es wird deutlich, dass sich die Dispersion im amidischen Bereich im Bidisulfid-Peptid **P17** nicht maßgeblich verändert im Vergleich zum Monodisulfid-Peptid **P2**. Auch die Dispersion der beiden Glycine erfährt keine Änderung, lediglich eine Kopplung für Gly⁶ ist im Tetrasulfid-Peptid **P17** nicht mehr sichtbar. Die Temperaturgradienten im Tetrasulfid zeigen gegenüber dem Disulfid keine signifikanten Änderungen. Wird die Faltungspopulation durch den ACS-Wert angegeben, so wird eine

geringere Population von 91% für das Bidisulfid-Peptid **P17** erhalten (Monodisulfid-Peptid als 100%-Referenz).

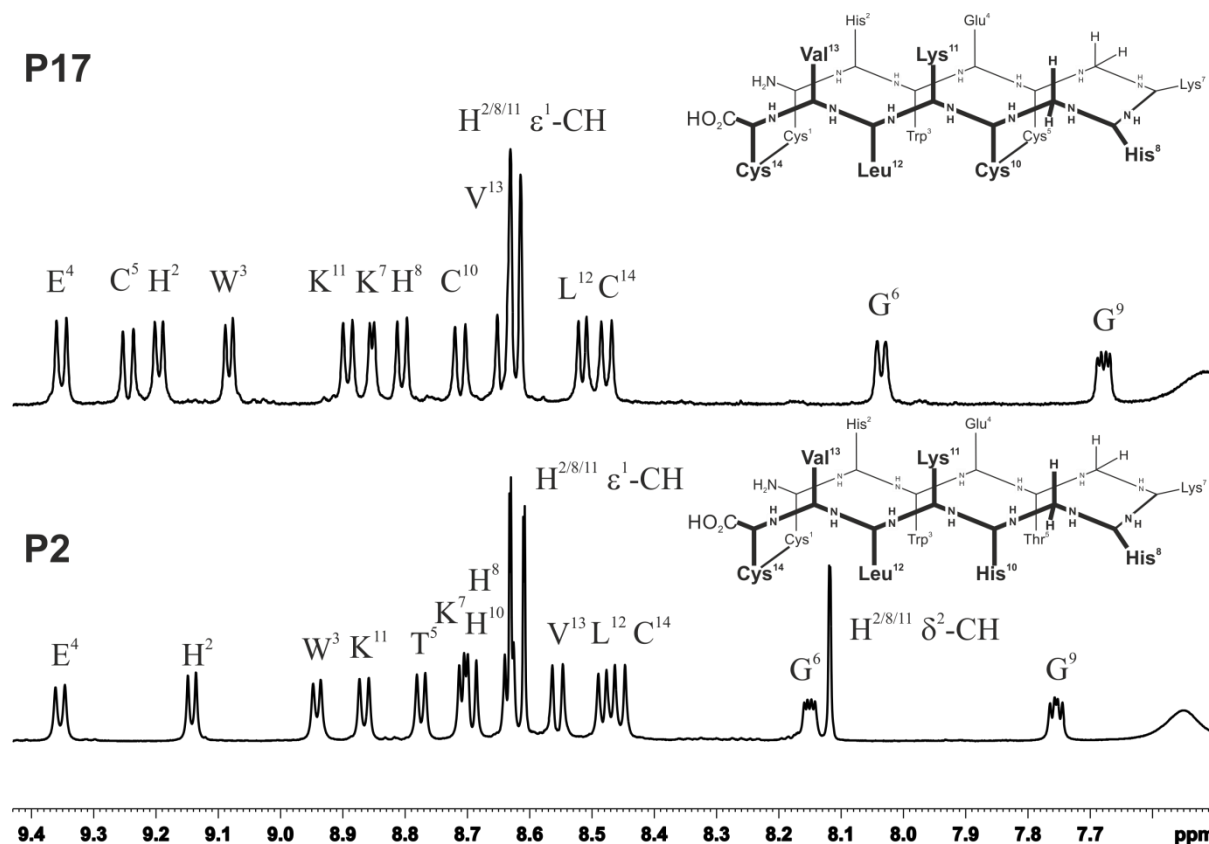


Abbildung 4-33: Amidbereich der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/ D_2O 9:1) der Peptide **P2** und **P17** im Vergleich.

Zusätzlich kann im Zuge dieser Serie die Hochfeldverschiebung von $\text{Leu}^{12}\text{-}\delta\text{-CH}_3$ nicht uneingeschränkt als Merkmal zur Strukturierung des Peptids genutzt werden, da im Zuge der Reduktion des relativen Anteils des hydrophoben Clusters bei eif5a-Anteilen größer 71% diese Aminosäure zum entsprechenden Lys^{12} aus der eif5a-Sequenz mutiert wird. Es kann dabei beobachtet werden, dass bei schrittweiser Erhöhung des eif5a-Epitop-Anteils die chemische Verschiebung von $\text{Leu}^{12}\text{-}\delta\text{-CH}_3$ einen deutlichen *Shift* ins Tieffeld erfährt, wobei die chemische Verschiebung in Peptid **P18** schon einem Wert entspricht, der mit tabellierten *random-coil* Verschiebungen übereinstimmt.^[155] In Abbildung 4-34 sind die chemischen Verschiebungen der Peptide **P17-P20** für $\text{Leu}^{12}\text{-}\delta\text{-CH}_3$ in einem Säulendiagramm dargestellt.

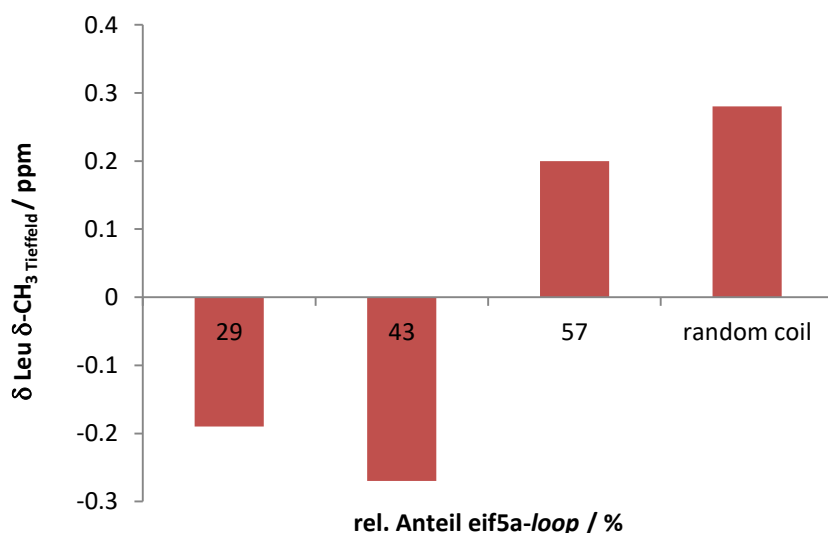


Abbildung 4-34: Chemische Verschiebung von $\text{Leu}^{12}\text{-}\delta\text{-CH}_3$ in Abhängigkeit des relativen Anteils an eif5a-Aminosäuren an der Gesamtstruktur. Während für das Bidisulfid **P17** (29%) und das entsprechende Monodisulfid **P2** (43%) noch negative chemische Verschiebungen verzeichnet werden, ähnelt die letzte Leu-haltige Struktur in **P18** (57%) schon sehr stark einer ungeordneten *random-coil*-Struktur.

Da die Erhöhung des eif5a-Epitop-Anteils die Mutation von Leu^{12} zu Lys^{12} erfordert, müssen weitere Parameter zur Quantifizierung der Faltungspopulation angewendet werden. Da bereits die Mutation von $\text{Glu}^4/\text{Lys}^{11}$ zu $\text{Lys}^4/\text{Ala}^{11}$ in **P18** den ACS-Wert von quantitativ (Referenzwert) auf 16% reduziert, kann dieser Parameter auch nicht weiterführend genutzt werden, um eine Aussage über Faltungspopulationen treffen zu können. Weitergehend kann die Dispersion der amidischen Protonen betrachtet werden, welche in Abbildung 4-35 dargestellt ist.

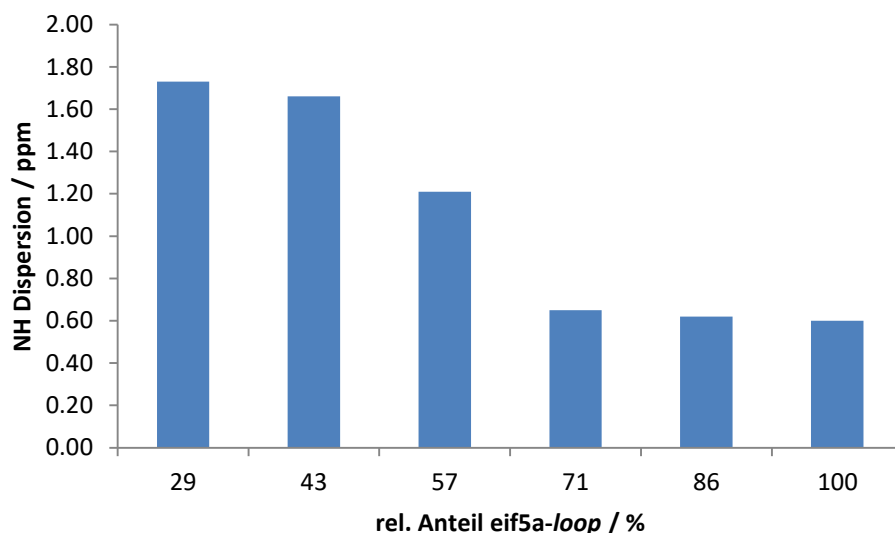


Abbildung 4-35: Dispersion der amidischen Protonen in Abhängigkeit des relativen Anteils an eif5a-Aminosäuren an der Gesamtstruktur. Es wird deutlich, dass die Reduktion des hydrophoben Cluster-Anteils zu einer Destabilisierung der Struktur führt, sodass bereits bei 71% die Amiddispersion der dargestellten Peptide in etwa der Dispersion der nativen eif5a-Sequenz (100%) entspricht.

Es wird deutlich, dass die Amiddispersion bis hin zu **P19** mit 71% eif5a-Anteil kontant abnimmt, während in den darauffolgenden Mutationen keine sichtbare Änderung der Dispersion mehr erkennbar ist. Die Werte für die Peptide **P19** und **P20** entsprechen dabei dem nativen, komplett ungefalteten eif5a-Peptid **P1**. Ein analoger Trend kann bei Betrachtung der Glycin-Dispersion erhalten werden (Abbildung 4-36).

Aus den hier durchgeführten Studien kann geschlossen werden, dass bereits die Mutation des ersten Aminosäure-Paares aus dem hydrophoben Cluster einen Einfluss auf die Faltungspopulation hat. Eine Gewichtung dieser Beobachtung ist auf Basis der diskutierten Parameter nur bedingt möglich. Da Leu¹² im Zuge der Mutationen ausgelöscht wird, kann nur noch die Glycin-Dispersion als Anhaltspunkt zur Quantifizierung der Faltungspopulation genutzt werden (Abbildung 4-36). Nimmt man dabei das komplett ungefaltete Peptid **P1** ohne Glycin-Dispersion und **P2** als Referenzwerte, so wird bei der Mutation von 57% (**P18**) auf 71% (**P19**) relativer eif5a-Anteil die Faltungspopulation von einer quantitativen Faltung auf 15% reduziert. Um eine möglichst hohe Faltungspopulation zu gewährleisten, wurde im Rahmen dieser Arbeit weitergehend der hydrophobe Cluster in seiner kompletten Sequenz als stabilisierendes Element genutzt, um die *loop*-Sequenz des eif5a-Proteins in einer Vorzugskonformation darzustellen.

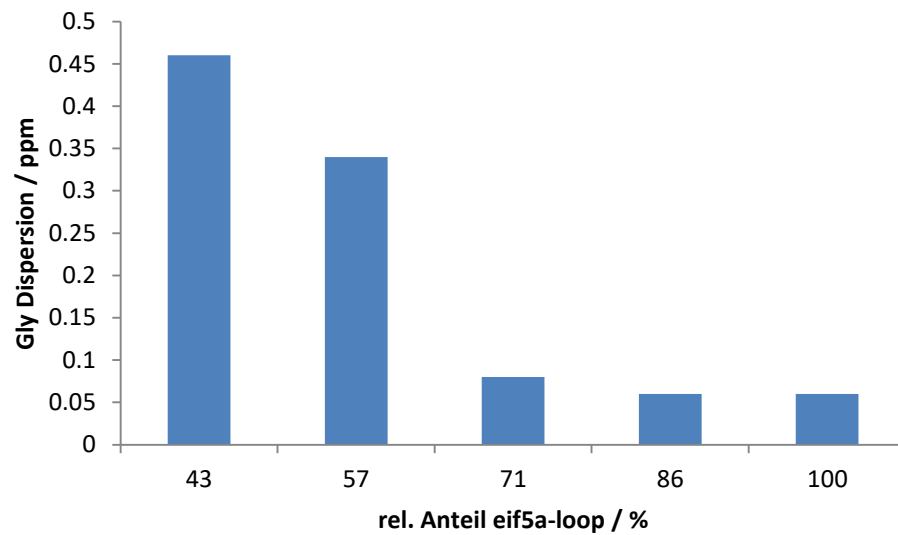


Abbildung 4-36: Glycin-Dispersion in Abhängigkeit des relativen Anteils an eif5a-Aminosäuren an der Gesamtstruktur. Es ist ein analoger Trend zur Amiddispersion erkennbar: Die Reduktion des hydrophoben Clusters führt zu einer Destabilisierung der Struktur, wobei die Struktur bei Mutation des Trp³-Leu¹²-Aminosäure-Paares kollabiert.

4.8 pH-Abhängigkeit der Faltung des β -hairpins

Da die Sequenz des Peptids **P2** nachfolgend in den biologischen Studien angewendet wird, wurde die pH-Wert-Abhängigkeit der Faltung dieses Peptids untersucht. Bisherige strukturelle Analysen wurden bei pH 3 durchgeführt wurden, woraus noch nicht gefolgert werden kann, wie sich das Peptid unter den pH-neutralen Bedingungen der Durchflusszytometrie strukturell verhält. Dazu wurde in etwa immer die gleiche Menge des aufgereinigten und oxidierten Peptids **P2** in Phosphatpuffer (pH 3.0 bis pH 7.0 in 0.5 Einheiten, 9:1 D₂O, TSP) gelöst und NMR-spektroskopisch untersucht. Hierzu wurde immer eine neue Probe angesetzt, da bei dem Einsatz der immer identischen Probe, bei welcher der pH-Wert durch die Zugabe entsprechender Salze bzw. Salzlösungen eingestellt wird, ein hoher Salzgehalt in der Probe erzeugt wird. Dies erschwert die Optimierung des äußeren Magnetfelds in der NMR-spektroskopischen Messung, was oft in großen Halbwertsbreiten der Signale resultiert. Ausschnitte aus dem Amidbereich bei verschiedenen pH-Werten sind in Abbildung 4-37 gezeigt. Es wird deutlich, dass sich die gesamte Dispersion der Amidsignale im Zuge der Erhöhung des pH-Wertes nur unwesentlich ändert, sodass auf der Basis dieses Parameters gefolgert werden kann, dass sich die Faltungspopulation des Peptids im Zuge der pH-Wert-Änderung nicht maßgeblich verändert. Bei Betrachtung der einzelnen Signale erfährt das Amidproton von Cys¹⁴ im Zuge der Erhöhung des pH-Wertes einen starken Hochfeld-Shift beim Sprung von 3.0 auf 5.0, was damit erklärt werden kann, dass bei etwa einem pH-Wert von 4.7 der pK_s-Wert der freien Carbonsäure überschritten wird. His²-NH ist bei pH-Werten größer als 5.5 nicht mehr sichtbar, was für weitere Amide ebenso der Fall ist, da bei einem pH-Wert von 7.0 nur noch zehn der 13 Amide sichtbar sind. Die Signale für His² und die beiden *turn*-Aminosäuren Lys⁷ und His⁸ sind nicht mehr sichtbar.

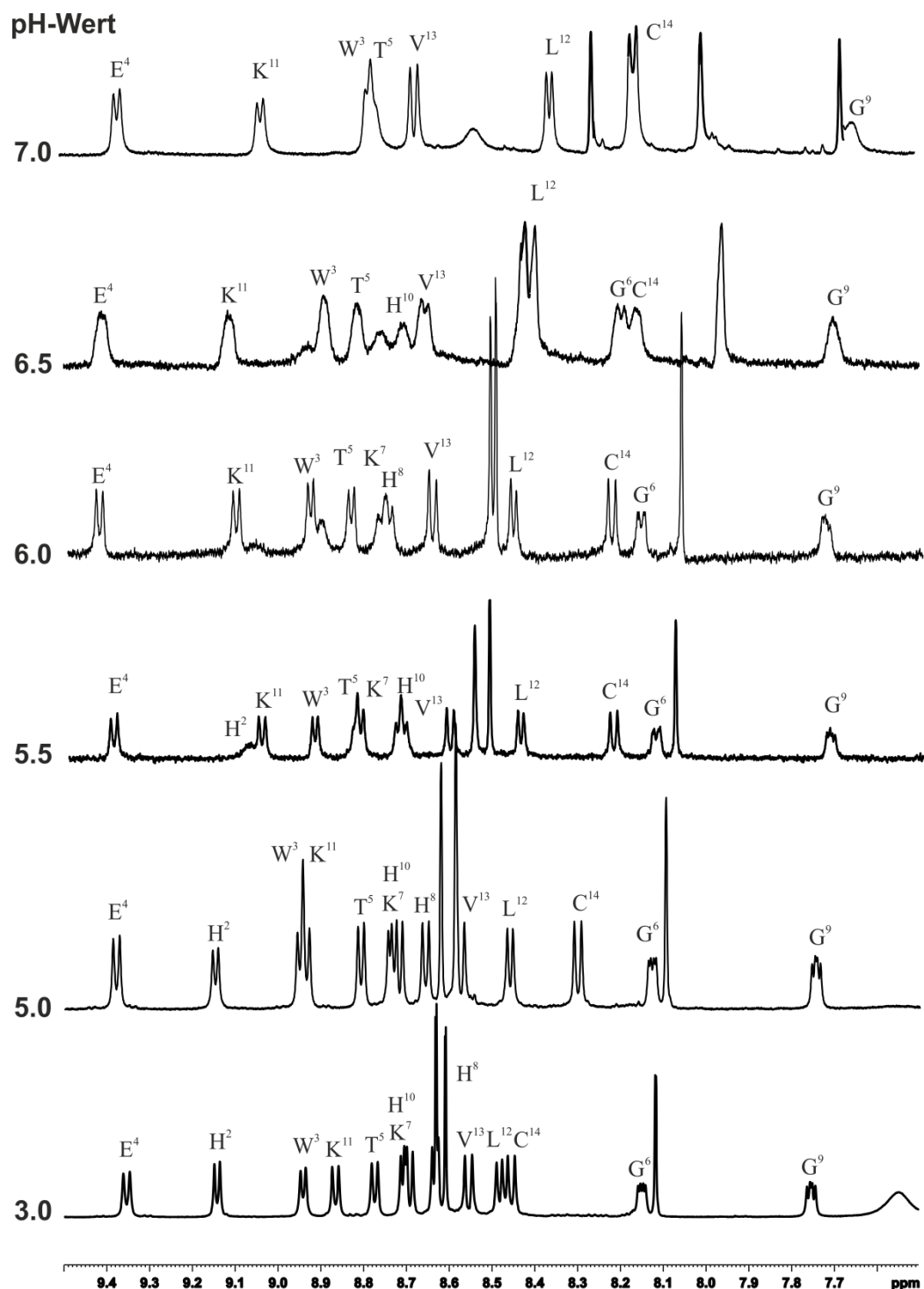


Abbildung 4-37: Amidprotonen (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) des Peptids **P2** in Abhängigkeit des pH-Wertes: Es wird deutlich, dass sich die Amiddispersion im Zuge der Erhöhung des pH-Wertes nicht maßgeblich ändert, weshalb von keiner signifikanten Änderung der Faltungspopulation ausgegangen werden kann, sodass Peptide dieser Grundstruktur in den biologischen Experimenten eingesetzt werden können und das entsprechend detektierte biologische Signal unter Annahme ähnliche Koformationen mit der Sekundärstruktur des Peptids korreliert werden kann.

4.9 Das KH-turn Motiv im Vergleich mit bekannten turn-Motiven

Lys und His in den *turn*-Positionen $i+1$ und $i+2$ sind für β -hairpin-Peptide sehr ungewöhnlich und neben dem bereits beschriebenen doppelten Gly-Motiv ein markantes Strukturmerkmal des eif5a-Proteins. Um die Stabilität und die strukturellen Eigenschaften dieser Sequenz im Kontext der Flankierung von zwei flexiblen Glycin-Einheiten in den Positionen i und $i+3$ zu untersuchen, wurde eine Serie von Peptiden synthetisiert, bei welchen die Aminosäuren in den Positionen 7 und 8 durch entsprechende, in β -hairpin Strukturen bekannte und etablierte Dipeptid-Einheiten ersetzt wurden. Neben den bereits im Kapitel 4.2 beschriebenen D-konfigurierten Aminosäuren in **P3** und **P4**, wurden Peptide mit Asn⁷-Gly⁸ **P23** und phe⁷-Pro⁸-turn **P21** synthetisiert.^[189,190] phe⁷-Pro⁸ ist häufig in β II'-turn Regionen zu finden.^[191–194] Zusätzlich wurde das in der Arbeitsgruppe Geyer entwickelte Dipeptid-Mimetikum Hot⁷=Tap⁸ in **P24** verwendet.^[195] Aufgrund der zwei kovalent-zyklischen Bindungen sind nur bestimmte ϕ - und ψ -Winkel möglich, was darin resultiert, dass Hot=Tap zur Induktion von β II'-turns neigt.^[196–198] Auch das von Nowick *et al.* entwickelte flexible Dipeptidmimetikum, bei welchem die Dipeptid-Einheit aus der Seitenkette eines D-Ornithins besteht, wurde in **P22** eingesetzt.^[199] Die Strukturen sind in Abbildung 4-38 gezeigt.^[188]

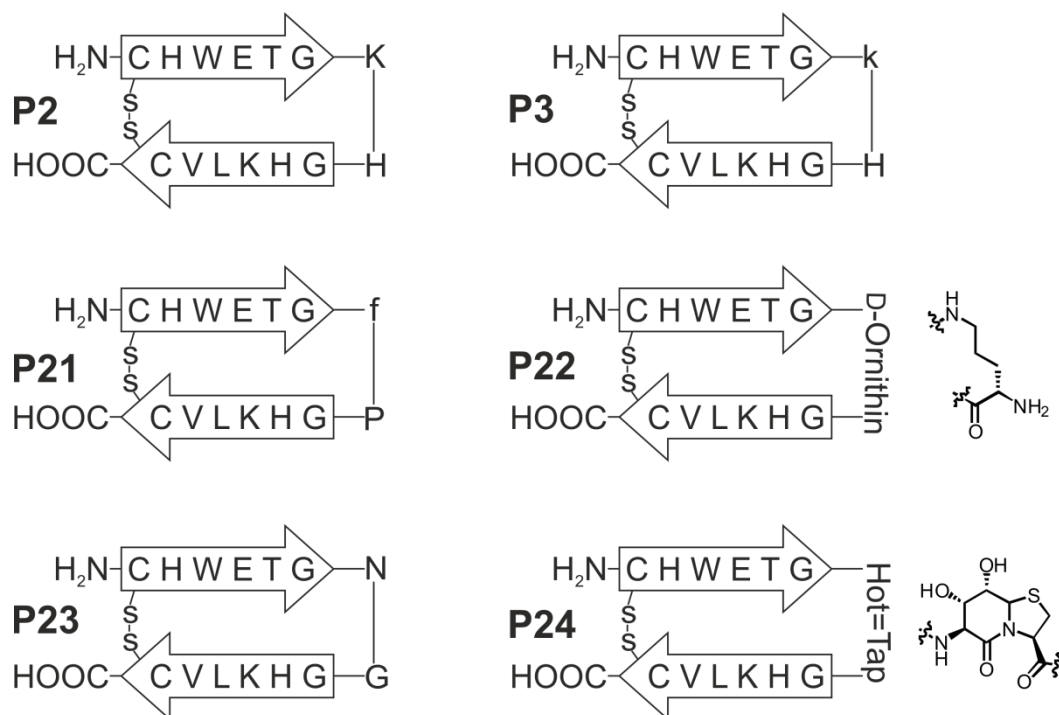


Abbildung 4-38: Darstellung der eif5a-Peptide mit Variation der *turn*-Aminosäuren.

Die NMR-spektroskopische Auswertung dieser Peptide ist in Abbildung 4-39 zusammengefasst.

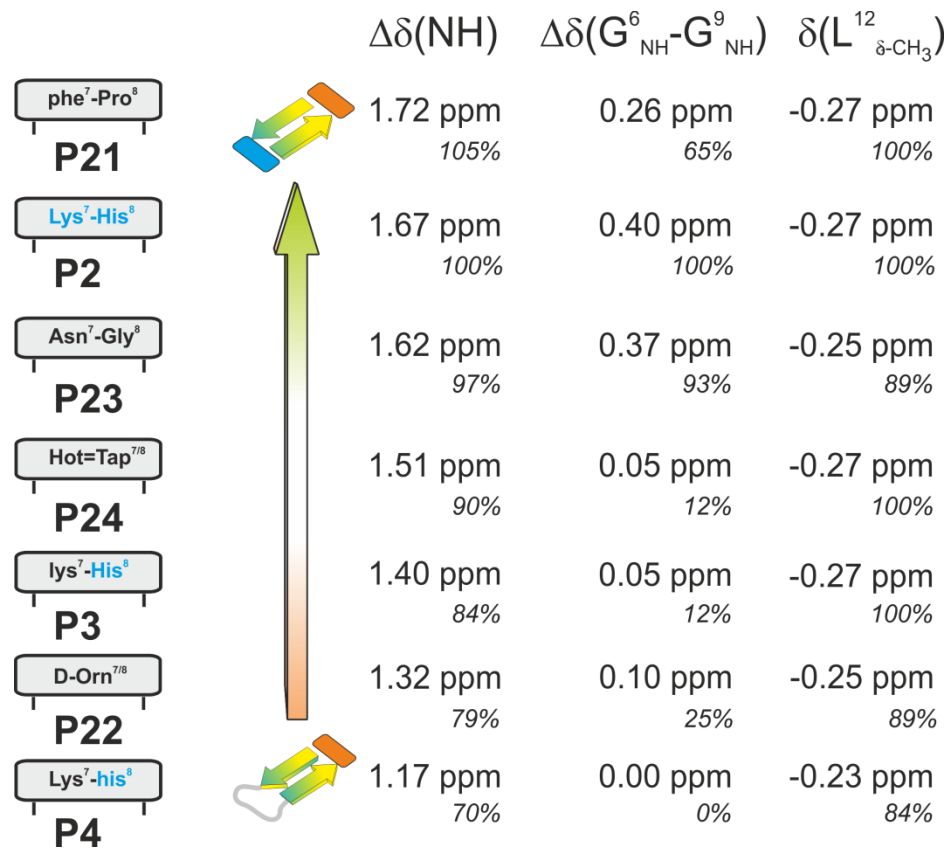


Abbildung 4-39: NMR-spektroskopische Daten der Peptide mit *turn*-Mutationen. Die entsprechenden Faltungspopulationen sind mit folgenden Referenzwerten berechnet: $\Delta\delta(\text{NH})$ und $\Delta\delta(\text{G}^6 - \text{G}^9)$ – Dispersion von **P2** und 0 ppm als Referenz. $\delta(\text{L}^{12} \delta\text{-CH}_3)$: **P2** und *random coil*-Wert nach Wishart als Referenz.

Es wird deutlich, dass der natürliche Lys⁷-His⁸-*turn* (blau) in **P2** eine hohe Amiddispersion aufweist, die nur vom in der Natur häufig vertretenen phe⁷-Pro⁸-Moti **P21** übertroffen werden kann. D-Aminosäuren werden sehr unterschiedlich toleriert: Während lys⁷-His⁸ **P3** mit 1.40 ppm eine akzeptable Amiddispersion und eine geringe Glycin-Dispersion aufzeigt, fallen beide Werte für Lys⁷-his⁸ **P4** deutlich, sodass die *i*+2 in diesem Fall eine D-Aminosäure weniger toleriert. Im Vergleich von Asn⁷-Gly⁸ **P23** zu Hot=Tap^{7/8} **P24** wird deutlich, dass beide Peptide zwar eine ähnliche Dispersion für die Amidprotonen aufzeigen, sie sich jedoch in der Glycin-Aufspaltung signifikant unterscheiden. Dies ist besonders für das Asn⁷-Gly⁸-Peptid **P23** überraschend, da der *turn*-Bereich dieses Peptids durch insgesamt drei Glycin-Einheiten aufgespannt wird. Gly erweist sich in β -*turns* besonders in der *i*+2-Positionen als günstig, da hier die Wechselwirkung zwischen der Seitenkette und dem Carbonylsauerstoff der Peptidbindung verhindert wird. Das β -*turn* Mimetikum Hot=Tap^{7/8} in **P24** zeigt eine hohe Amiddispersion, während die Diskriminierung beider Glycine deutlich reduziert wird, was

damit erklärt werden kann, dass sich in diesem Peptid ein sehr starres Dipeptid-Mimetikum mit einer geringen Anzahl an Freiheitsgraden im *turn*-Bereich befindet und über die beiden flexiblen Glycin-Einheiten wird dieser Bereich, ähnlich wie ein Scharnier, vom hydrophoben Cluster entkoppelt, was sich in einer schnellen, ungerichteten Bewegung der Glycine und einer daraus resultierenden mittleren chemischen Verschiebung kenntlich macht. Wie erwartet zeigt das von Nowick *et al.*^[199–202] eingesetzte, flexible Dipeptid-Mimetikum D-Orn^{7/8} in **P22**, bei welchem die Peptidkette über die Ornithin-Seitenkette fortgesetzt wird, zeigt eine geringere Amiddispersion und auch nur eine geringe Aufspaltung der beiden Glycine, sodass diese flexible *turn*-Einheit in Kombination mit den beiden Glycinen viele Freiheitsgrade bietet, die die *turn* sehr beweglich werden lassen. Bei Betrachtung der Leu¹² δ -CH₃ Signale in allen Peptiden wird deutlich, dass deren chemische Verschiebungen sich nur unwesentlich ändern, was dafür spricht, dass sich in allen Strukturen der hydrophobe Cluster sehr gut ausbildet und sich daher nahezu unabhängig von der *turn*-Sequenz verhält.

Zur weiteren Strukturanalyse dieser Peptide wurden temperaturabhängige ¹H-NMR-Spektren aufgezeichnet und der Temperaturgradient bestimmt, welcher Information zum Netzwerk aus Wasserstoffbrücken bietet. Die Temperaturkoeffizienten der Amidprotonen der Peptide sind in Abbildung 4-40 zusammengefasst.

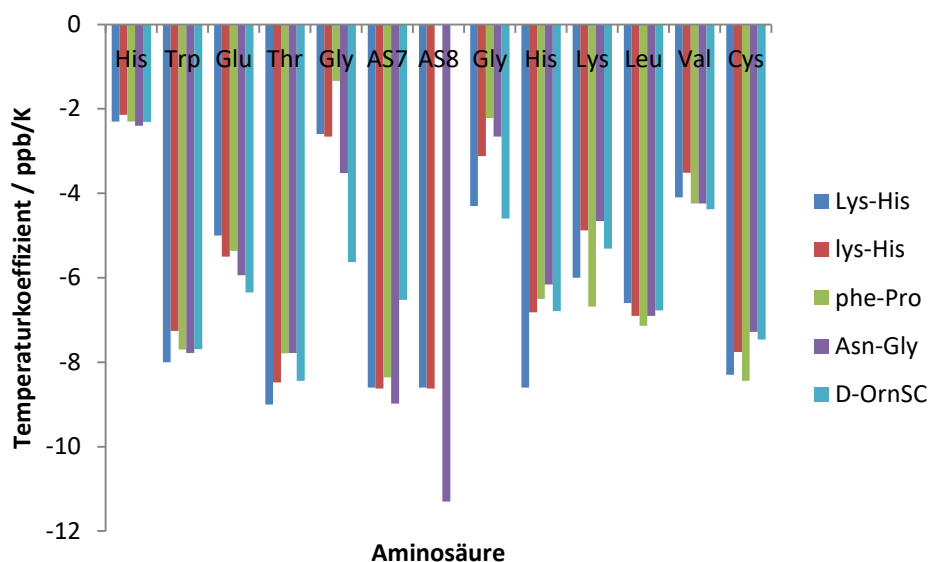


Abbildung 4-40: Temperaturkoeffizienten der *turn*-modifizierten Peptide **P21-P24**: Es wird deutlich, dass die Variation der *turn*-Aminosäuren in den Positionen *i+1* und *i+2* ausschließlich die Temperaturgradienten im *turn*-Bereich beeinflusst, während sich die Koeffizienten für die Cluster-Amidprotonen sich nicht signifikant verändern.

Bei Betrachtung der Temperaturkoeffizienten wird deutlich, dass die Variation der *turn*-Sequenz keinen signifikanten Einfluss auf die der Amide des hydrophoben Clusters hat. Starker Einfluss hingegen wird für die Koeffizienten der Amidprotonen in unmittelbarer Umgebung des *turns* beobachtet. Während für die Aminosäuren in $i+1$ und $i+2$ hohe Koeffizienten erhalten werden, da sich deren Amidprotonen nicht aktiv in einem Netzwerk aus Wasserstoffbrücken-Bindungen befinden, reagieren die beiden Glycin-Amide in den Positionen i und $i+3$ sehr sensitiv auf die durchgeführten Mutationen.

Bei genauerer Betrachtung kann dabei die Beobachtung aus Abbildung 4-41 verifiziert werden: Bei großer Glycin-Dispersion, wie beispielsweise im Lys⁷-His⁸-Peptid **P2**, werden vergleichsweise geringe Temperaturkoeffizienten erhalten, da die Amidprotonen in Wasserstoffbrücken eingebunden sind. Bei geringerer Dispersion der Glycine im D-Orn^{7/8}-Peptid **P22** steigen die Werte für die Temperaturkoeffizienten der beiden Gly-Amide deutlich an, weil die *turn*-induzierenden Eigenschaften durch die flexible Ornithin-Seitenkette verringert werden. Diese beiden Glycin-Einheiten entkoppeln also durch ihre eigene Beweglichkeit den starren Riegel des hydrophoben Clusters von der *turn*-Sequenz. Durch Mutation der *turn*-Aminosäuren wird also unmittelbar die Flexibilität und Beweglichkeit des *loops* beeinflusst. In Abbildung 4-41 sind die Temperaturkoeffizienten der Glycine gezeigt.

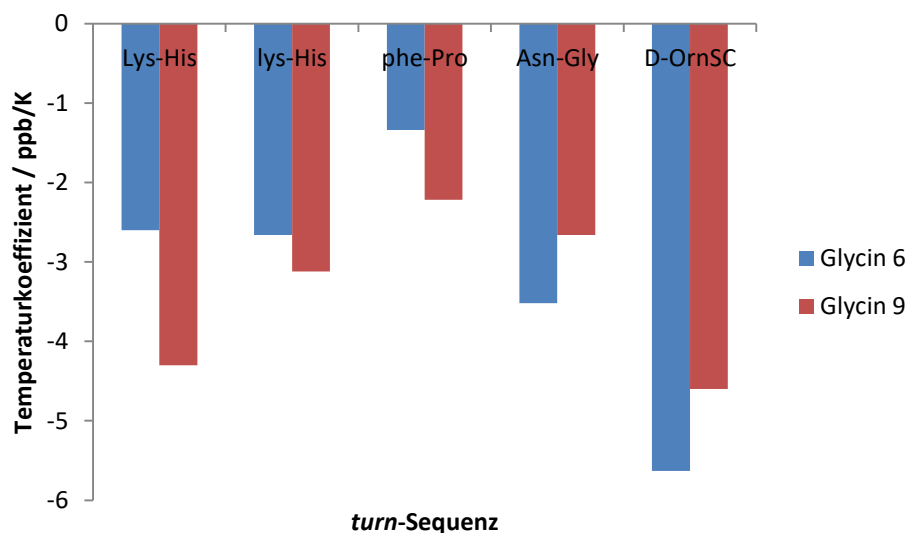


Abbildung 4-41: Temperaturkoeffizienten der Glycin-Amide in den *turn*-modifizierten Peptiden.

4.10 Vergrößerung des β -hairpins

Da die Variation des Anteils des hydrophoben Clusters im Abschnitt 4.7 zeigt, dass der Anteil der eif5a-Sequenz nicht beliebig variiert werden kann ohne das die Sekundärstruktur kollabiert, wurden die Peptidsequenzen verlängert, sodass bei einer gleichbleibenden Anzahl an Aminosäuren des hydrophoben Clusters der eif5a-Anteil verändert werden kann. Das Design dieser Peptide ist in Abbildung 4-42 gezeigt.^[188]

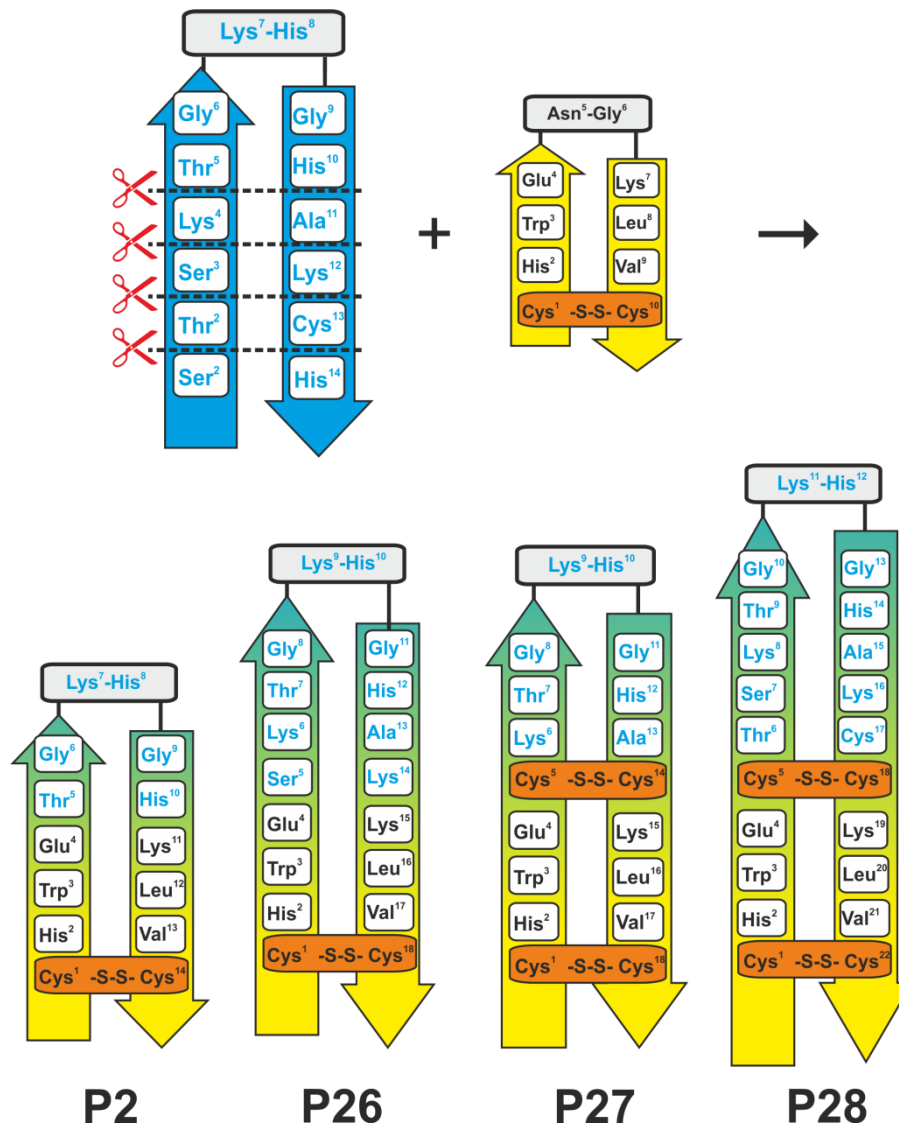


Abbildung 4-42: Struktur-Design zur Vergrößerung des eif5a-Anteils (blau) ohne signifikante Variation des Anteils des hydrophoben Clusters (gelb). Als Referenzverbindung ist das bereits beschriebene 14-Aminosäure-Disulfid-Peptid **P2** aufgeführt.

NMR-spektroskopische Analyse der Peptide mit 18 Aminosäuren zeigt, dass im Peptid **P26** sowohl Amid- als auch Glycin-Dispersion im Vergleich zu **P2** verringert sind. Weiterhin reagiert auch die Leu-Seitenkette auf die Vergrößerung der Peptidstruktur, was anhand der Tieffeldverschiebung von $\text{Leu}^{12/16}\text{-}\delta\text{-CH}_3$ deutlich wird. Aus diesem Grunde wurde untersucht, inwieweit die Installation eines zweiten intramolekularen Disulfids die Struktur **P27** stabilisiert. Dafür wurden die Aminosäuren Ser^5 und Lys^{14} durch zwei Cysteine ersetzt wie zuvor zum Disulfid oxidiert. Durch die zusätzlich eingefügte Restriktion der Struktur durch dieses Disulfid konnten beide Dispersionswerte erhöht werden und auch $\text{Leu}^{16}\text{-}\delta\text{-CH}_3$ zeigt eine erhebliche Hochfeldverschiebung im Vergleich zum einfachen Disulfid **P25** (Abbildung 4-43).

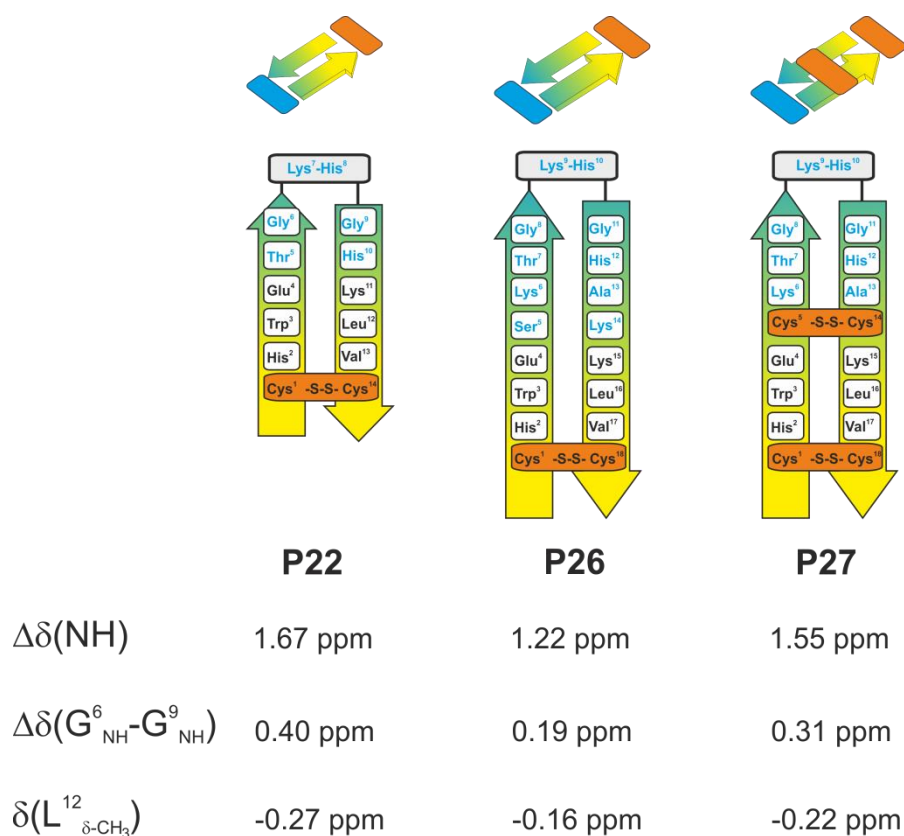


Abbildung 4-43: NMR-spektroskopische Analyse der 18 Aminosäure-haltigen Peptide **P26** und **P27** im Vergleich zu **P2**. Durch die Installation eines zweiten Disulfids wird eine zusätzliche Stabilisierung der Struktur erhalten. Im Zuge der Installation des zweiten Disulfids wird die Faltungspopulation von 89% auf 95% erhöht ($\text{Leu } \delta\text{-CH}_3$).

Die daraus resultierende Strategie, bei einem Zusammenbruch der Struktur im Zuge einer Erhöhung des eif5a-Anteils in immer größer werdenden Peptiden durch die Installation eines weiteren Disulfids im hydrophoben Cluster in einer nicht-Wasserstoffbrücken-gebundenen Position zu stabilisieren, wurde auf die nächstgrößere Peptid-Einheit von 22 Aminosäuren in

P28 übertragen. Dabei kommt es durch die vorgegebene Sequenz des eif5a-Anteils zur synthetischen Herausforderung, dass Peptid **P28** mit insgesamt 12 eif5a-Aminosäuren insgesamt fünf Cystein-Einheiten umfasst. Dabei befinden sich zwei Cys-Einheiten in unmittelbarer Nachbarschaft in den Positionen 17 und 18, wobei aber nur die Ausbildung der Disulfid-Brücke zwischen Cys⁵ und Cys¹⁸ die erwartete Stabilisierung aufgrund der *hairpin*-Periodizität erbringen sollte. Die Regioselektivität der durchgeführten Oxidation konnte dadurch nachgewiesen werden, dass sich die ¹³C-Verschiebungen einer Cystein β -Methylengruppe maßgeblich von einer Oxidierten unterscheiden. Die Identifikation dieser Methylen-Einheiten erfolgte im HSQC-Spektrum (Abbildung 4-44).

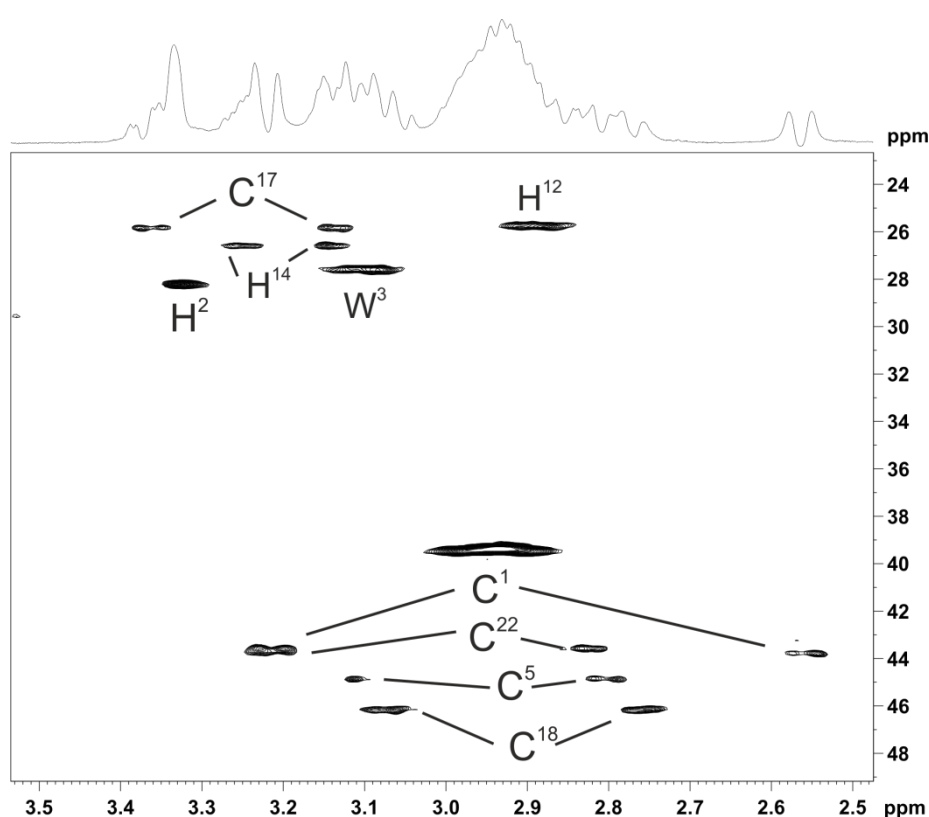


Abbildung 4-44: HSQC-Spektrum (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1) von Peptid **P28**: Nach sequential walk konnten die diastereotopen Methylengruppen eindeutig zugeordnet werden, was die Identifikation der reduzierten Cys¹⁷-Seitenkette bestätigte.

Zusätzlich zu dem oben gezeigten Nachweis wurde Mutation C¹⁷S **P29** dieses Peptids synthetisiert, was keine Nebenreaktion erlaubt. Im Vergleich der Amidbereiche der ¹H-NMR-Spektren der Peptide mit Cys¹⁷ **P28** bzw. Ser¹⁷ **P29** wird deutlich, dass beide Spektren nahezu identische Dispersion und Signallagen aufweisen, sodass bestätigt werden kann, dass sich regioselektiv hierbei nur das gewünschte Disulfid ausgebildet hat (Abbildung 4-45).

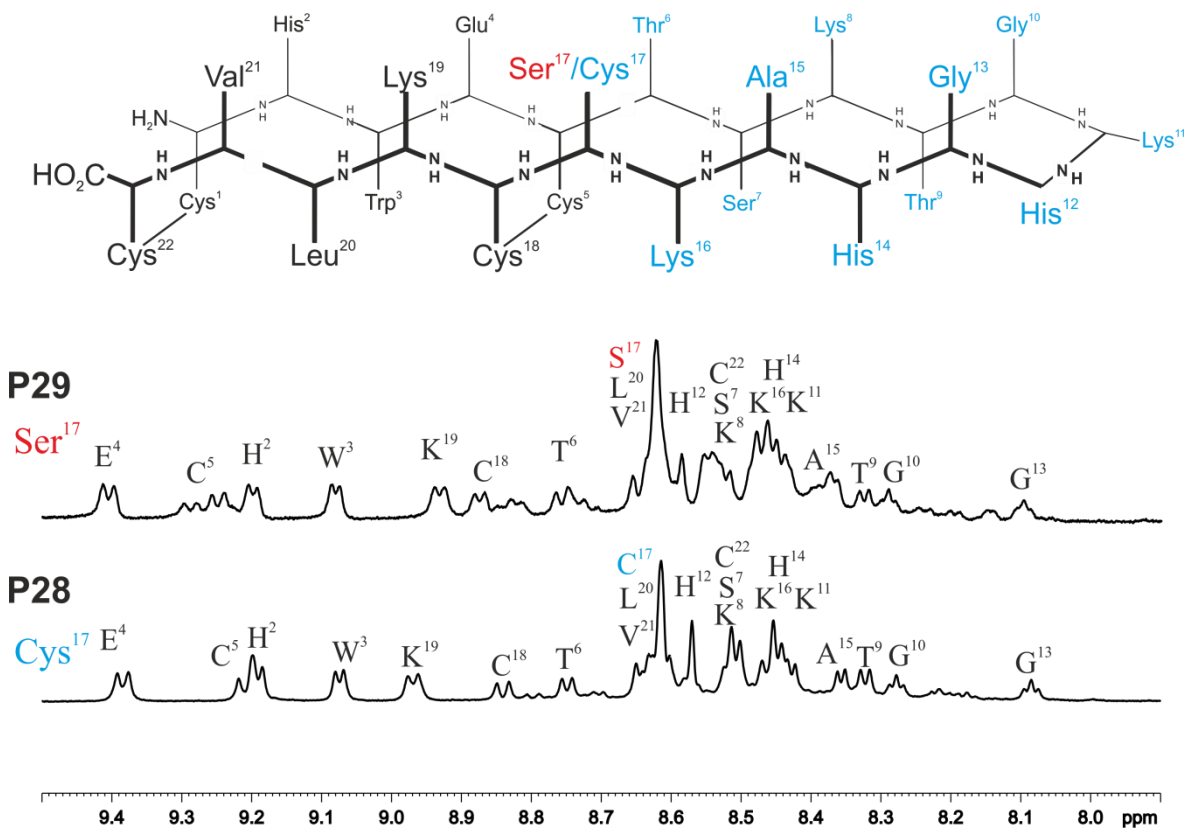


Abbildung 4-45: NMR-spektroskopische Analyse (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1) der 22er Peptide **P28** und **P29**: Anhand der NMR-spektroskopischen Daten kann die regioselective Disulfid-Oxidation zur gewünschten Struktur nachgewiesen werden.

Um zu beweisen, dass es sich hier noch immer um das freie Thiol in der Seitenkette handelt, wurde eine Succinimid-Thioether-Ligation angewendet (Abbildung 4-46a).^[203–206] Hierzu wurde ein *N*-terminal Maleimid-funktionalisiertes Dipeptid **28a** im NMR-Rohr mit Peptid **28** umgesetzt. Aufgrund der Addition des Thiols an das Maleimid entstehen zwei diastereomere Peptide (Abbildung 4-46b), welche dann im ¹H-NMR-Spektrum zwei unterschiedliche Signalsätze liefern (Abbildung 4-46c).

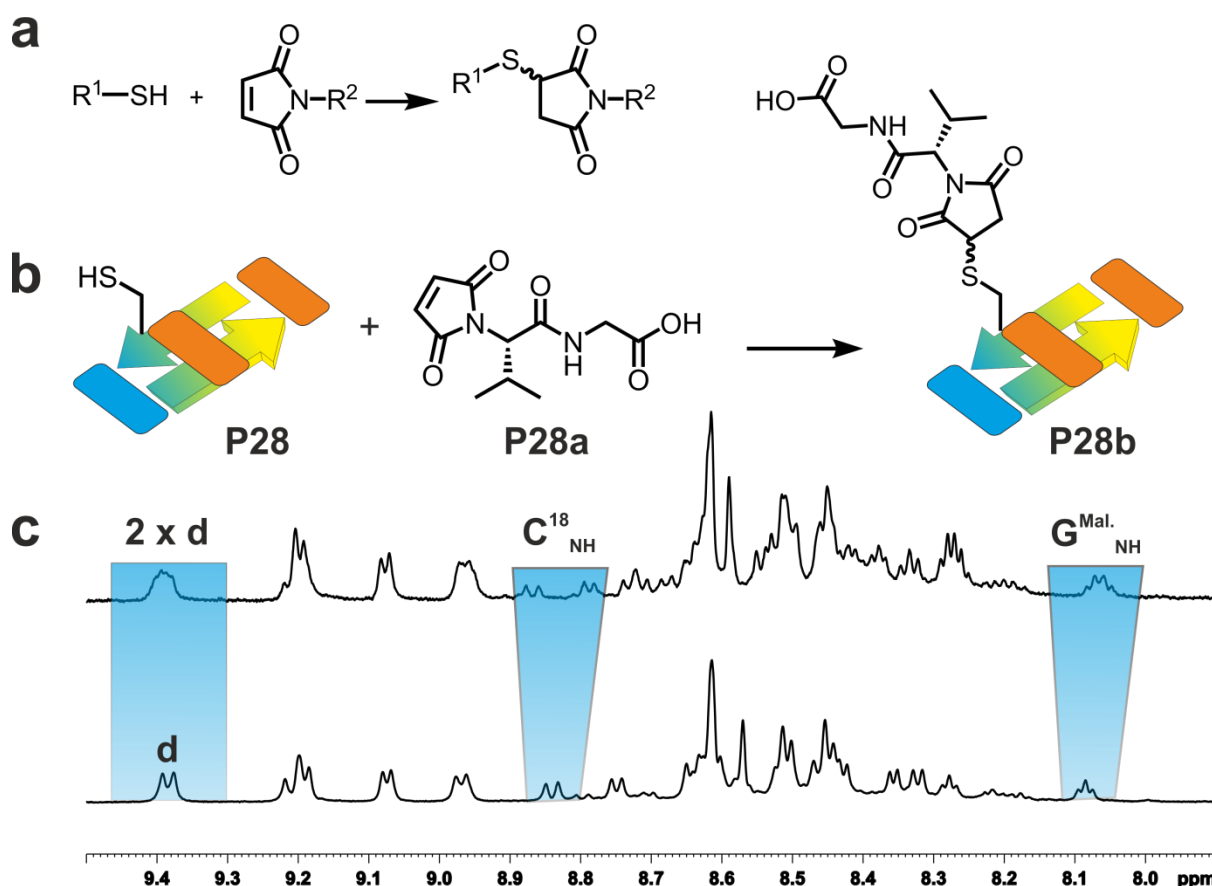


Abbildung 4-46: **a:** Syntheschema der Maleimid-Thioether-Ligation. **b:** Addition eines Maleimid-funktionalisierten Dipeptids **P28a** an das β -hairpin-Peptid **P28**, was in zwei diastereomeren Peptiden **P28b** resultiert. **c:** NMR-spektroskopische Auswertung (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1) beider diastereomeren Peptide.

Auch in der massenspektrometrischen Analyse kann das Additionsprodukt eindeutig nachgewiesen werden. Weiterhin wurde versucht mit einem Maleimid-funktionalisiertem Farbstoff (Fluorescein-5-Maleimid, F5M) die Addition mittels UV-Vis nachzuweisen. Dabei wurde in Testreaktionen mit reduziertem Glutathion festgestellt, dass in der Größenordnung der UV-relevanten Konzentrationen ein ca. 2000-facher Überschuss an Thiol vorgelegt werden muss, um einen quantitativen Umsatz zu erhalten. Aufgrund der begrenzten Menge des vorhandenen Peptids wurde dies nicht weiter verfolgt.

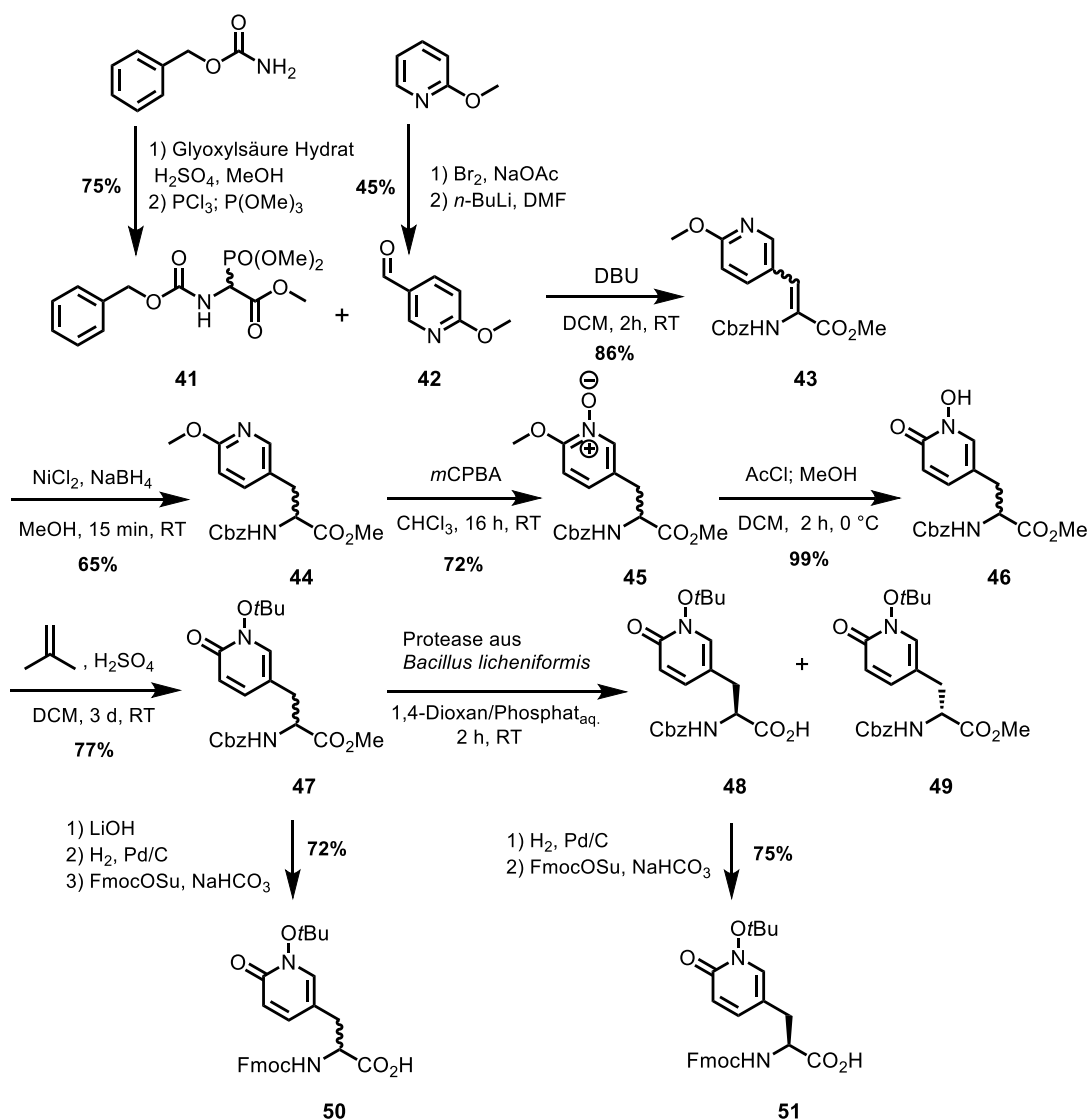
Durch die erfolgreiche Synthese der Peptide **28**, die sich in ihrem Anteil des eif5a-Epitops, nicht jedoch in der Größe des hydrophoben Clusters unterscheiden, konnte gezeigt werden, dass diese Strategie auch für weitere β -hairpin Epitop-Stabilisierungen verwendet werden kann. Auch die Einführung eines zweiten Disulfids hat bei immer größer werdenden *loop*-Strukturen einen stabilisierenden Effekt. Bei Peptiden mit mehr als 22 Aminosäuren konnte aufgrund der geringen Löslichkeit in Wasser keine Aufreinigung und Strukturanalyse mittels

NMR-Spektroskopie durchgeführt werden. Der Nachweis mittels Maleimid-Thioether-Addition kann ferner als Ligationsmethode genutzt werden, um das designte eif5a-Hybridepitop **28** an weitere Strukturen unter physiologischen Bedingungen binden zu können.

4.11 Epitop-Oligomerisierung mittels Metalkomplexierung

4.11.1 Synthese der Hydroxypyridon-funktionalisierten Aminosäure

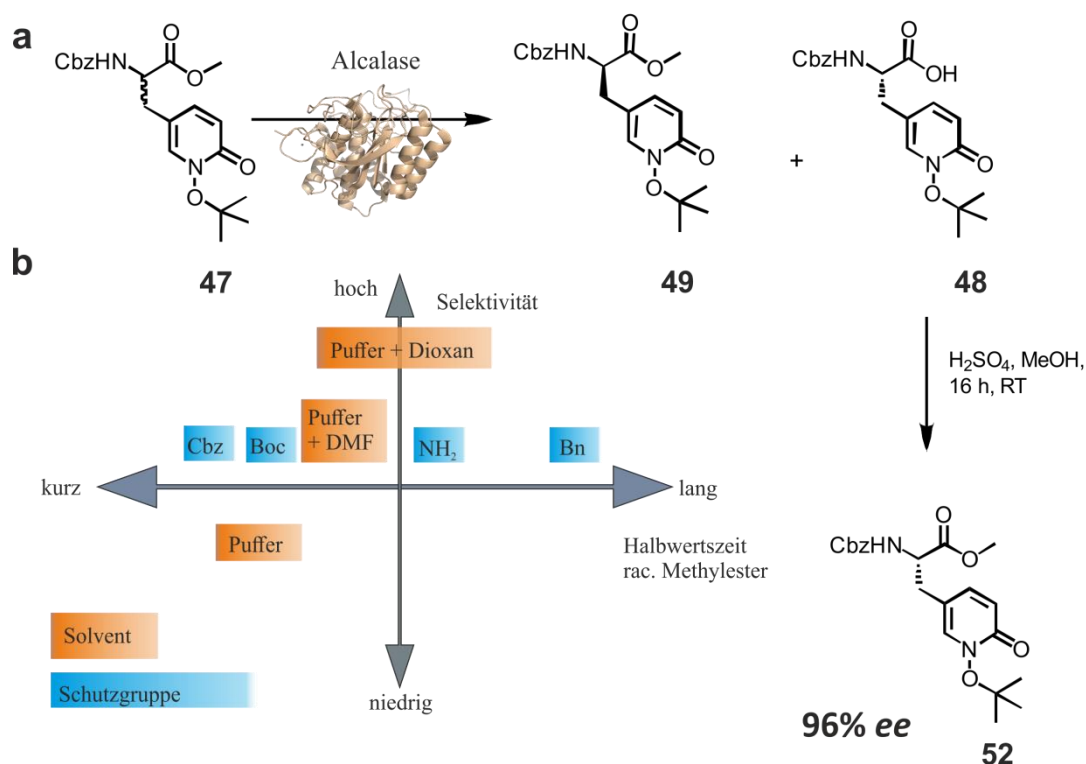
Da das eif5a-Protein, wie viele weitere Proteine auch, als Dimer auftritt und auch in dieser Form isoliert wurde, wurde eine Methode zur Oligomerisierung des Peptids **P2** entwickelt. Basis dafür bildete die in der Arbeitsgruppe Geyer entwickelte Aminosäure Hop, deren Synthese erstmals in der Dissertation von *Timm Diogo* beschrieben wurde.^[207] Diese Aminosäure kann in einer achtsufigen Synthese, ausgehend von einem Glycin-Phosphonat^[208,209] und 5-Formyl-2-methoxypyridin^[210,211] dargestellt werden. Die Seitenkettenfunktionalität dieser Aminosäure ist sehr ungewöhnlich und weicht deutlich von den oft verwendeten Strukturmotiven in der Metallopeptidchemie wie beispielsweise 2,2-Bipyridin^[212,213], 8-Hydroxychinolin^[214] oder EDTA/DOTA-Analogen^[215,216] ab. *N*-Hydroxy-1,2-pyridone (HOPO) sind ein weit verbreitetes Strukturmotiv in der medizinischen Chemie. Ihre Anwendung reicht von anti-viraler^[67] bis zur anti-fungaler^[217] Aktivität. Auch sind einige Gd^{III}-HOPO-^[216,218–221] bzw. Mn^{III}-HOPO^[222]-Hybride als MRT-Kontrastmittel beschrieben worden. Ebenso wurde 1,2-HOPO als effektives Kupplungsreagenz in der Peptidsynthese bekannt.^[223] Die hier angewandte Synthese verwendet eine enzymatische Hydrolyse eines α -Aminosäuremethylesters als Schlüsselschritt, wobei stereoselektiv über nur das L-Isomer des Methylesters hydrolysiert wird, während der D-Ester keinerlei Reaktivität zeigt.^[224–227] Diese Synthesemethode unterscheidet sich deutlich von den bekannten Methoden zur Darstellung unnatürlicher α -Aminosäuren, wie beispielsweise asymmetrische *Strecker*-Synthese^[228], asymmetrische Rh-katalysierte Hydrierung von α -Dehydroamino säuren^[229,230] oder die Stereoinduktion durch *Evans*-ähnliche Alkylierung bzw. Aziridierung.^[231,232] Die hier beschriebene Methode kann vermutlich auf eine breite Substratplattform von β -arylierten α -Aminosäuren angewendet werden.^[224,227] Die Synthese ist in Schema 4-5 gezeigt.



Schema 4-5: Synthese der enantiomerenreinen Aminosäure Fmoc-L-Hop(*t*Bu)-OH **51** bzw. der racemischen Aminosäure Fmoc-DL-Hop(*t*Bu)-OH **50**.

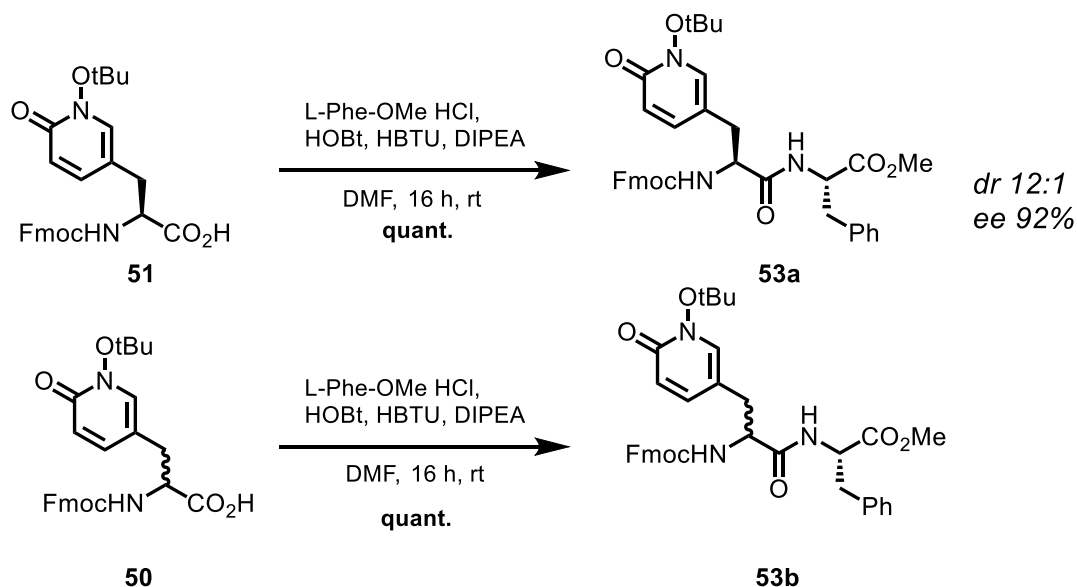
Die Kondensation von Benzylcarbamate mit Glyoxylsäure und anschließende *Michaelis-Arbusov*-Reaktion führt zum α -Phosphonoglycintrimethylester **41**.^[208,233] 5-Formyl-2-methoxypyridin **42** wird durch Bromierung und anschließende Formylierung ausgehend von 2-Methoxypyridin erhalten.^[210,211] In einer *Horner-Wadsworth-Emmons*-Reaktion wird das Olefin **43** durch die Umsetzung von **41** mit **42** erhalten. Das Olefin liegt laut ^1H -NMR-Spektroskopie in einem *E/Z*-Verhältnis von 8:1 vor. Reduktion der olefinischen Doppelbindung liefert die racemische α -Aminosäure **44**.^[234–236] Durch Oxidation des Pyridin-Stickstoffs mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA) wird Verbindung **45** erhalten. Durch Acylierung des *N*-Oxids **45** und darauffolgender Methanolyse wird die 1,2-Hydroxypyridon-Funktionalität der Aminosäure **46** erhalten.^[237,238] Diese funktionelle Gruppe muss für die Anwendung in der Festphasenpeptidsynthese orthogonal zur Fmoc-Schutzgruppe geschützt

werden, sodass das Hydroxypyridon mittels Isobuten und Schwefelsäure mit einer *t*Bu-Schutzgruppe **47** versehen wird.^[239] Die Hydrolyse des Methylesters von **47** mit der Protease von *Bacillus licheniformis* (Alcalase) ist der Schlüsselschritt der Reaktion und liefert die freie Carbonsäure des L-Isomers **48**, während der D-Ester **49** nicht umgesetzt wird, sodass mittels Flüssigextraktion beide Isomere voneinander getrennt werden können.^[224–227] Dieser Schlüsselschritt wurde hinsichtlich des Enantiomerenüberschuss (*ee*) von **48** optimiert und die besten Ergebnisse können mit 1,4-Dioxan als Cosolvens erhalten werden (Schema 4-6). Durch die erneute Umsetzung von **48** zum respektiven L-Methylester **52** lieferte das Substrat für die Analyse des Enantiomerenüberschuss mittels chiraler HPLC. Es konnte ein *ee* von 96% bestimmt werden.



Schema 4-6: Enzymatische Hydrolyse des racemischen α -Aminosäuremethylesters **47**: **a**: Die erhaltene L-konfigurierte Aminosäure **48** wird nach Isolation erneut in ihren Methylester **52** überführt zur stereochemischen Analyse mittels chiraler HPLC. Es konnte ein *ee* von 96% bestimmt werden, welcher auch durch eine Dipeptidkupplung verifiziert werden konnte. **b**: Optimierung der Reaktionsbedingungen. Die besten Bedingungen konnten mit Cbz als N-terminale Schutzgruppe und 1,4-Dioxan als Cosolvent gefunden werden. Das entsprechende Substrat mit der Fmoc-Schutzgruppe war in allen Lösungsmittelkombinationen unlöslich.

Der mittels chiraler HPLC bestimmte *ee* konnte durch die eine Dipeptidkupplung verifiziert werden (Schema 4-7)



Schema 4-7: Synthese der Dipeptide von Fmoc-L-Hop(*t*Bu)-OH **51** bzw. Fmoc-DL-Hop(*t*Bu)-OH **50**: Unter der Annahme, dass während der Reaktion keine Stereoinformation von H-L-Phe-OMe verloren geht, kann das Diastereomerenverhältnis (*dr*) und damit auch der Enantiomerenüberschuss aus den Integralverhältnissen der amidischen Protonen berechnet werden. Es konnte der bereits zuvor bestimmte *ee* durch ein Diastereomerenverhältnis von 12:1 bestätigt werden.

Die Variation der *N*-terminalen Schutzgruppe liefert schließlich das Fmoc-geschützte Derivat **51**, welches direkt in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden kann. Auch das racemische Derivat **50** kann dementsprechend erhalten werden. Das L-Isomer **51** wurde über acht Stufen (längste lineare Synthese) in einer Ausbeute von 21% erhalten.

4.11.2 Metallkomplexierende Eigenschaften der Aminosäure

Zur Untersuchung der metallkomplexierenden Eigenschaft der Aminosäure **50** bzw. **51** wurde eine NMR-Titration mit $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ durchgeführt. Ga^{3+} wurde dabei als Ersatz für Fe^{3+} gewählt, da diese beiden Kationen sehr ähnliche Ionenradii aufweisen und es bereits bekannt ist, dass Ga^{3+} in biologischen Systemen Fe^{3+} sehr gut nachahmt.^[139,240,241] Auf der NMR-Skala hat Ga^{3+} den großen Vorteil, dass durch seinen Diamagnetismus keine Anwendung komplexer Messmethoden zum Erhalt von paramagnetischen Spektren notwendig ist. Zudem ist Ga^{3+} redox-inert und sowohl in DMSO als auch in Wasser sehr gut löslich, was die Anwendung in diesen beiden NMR-Lösungsmitteln möglich macht. Bei der durchgeführten Titration wurde ein Äquivalent $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ vorgelegt, die respektiven Äquivalente von 2-

Hydroxypyridin-1-Oxid (1,2-HOPO) hinzugefügt und die erhaltene Lösung wurde NMR-spektroskopisch untersucht. Die Titrationsreihe ist in Abbildung 4-47 gezeigt.

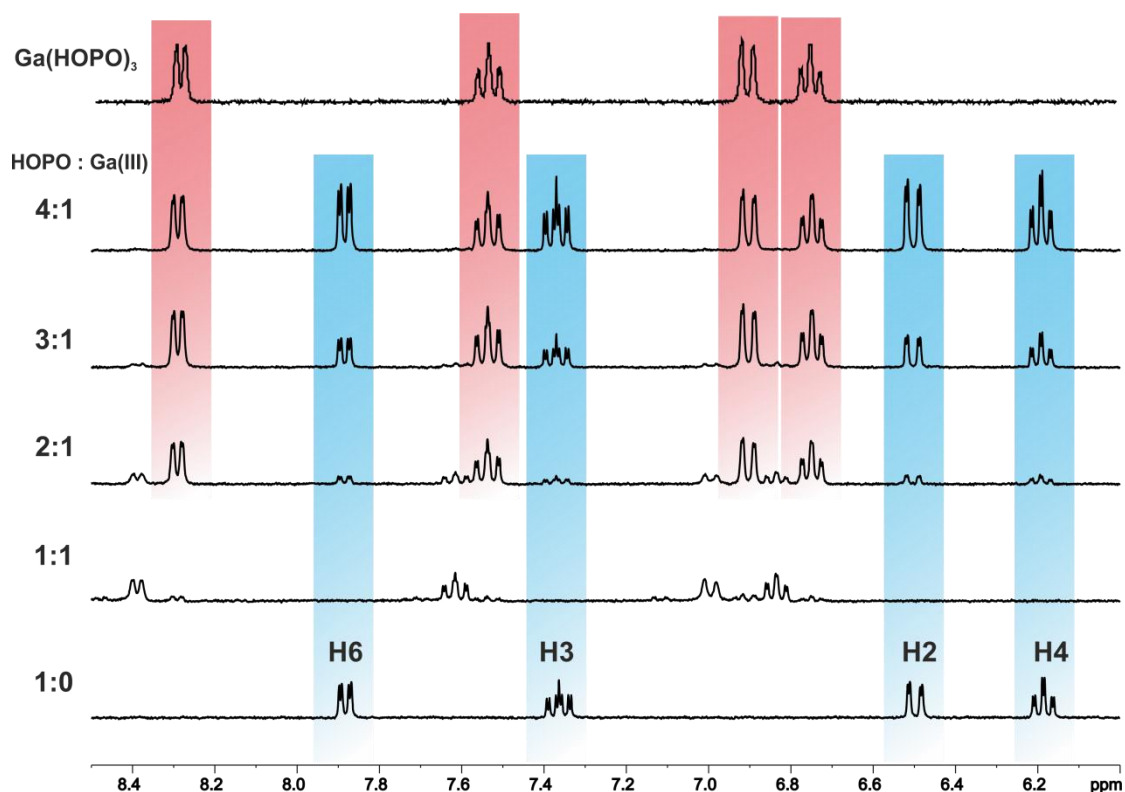


Abbildung 4-47: ^1H -NMR-Titration (300 MHz, 300 K, DMSO-d_6): Das obere Spektrum des trimeren $\text{Ga}(\text{HOPO})_3$ stammt von der isolierten Verbindung. Blau markiert die Signale des unkomplexierten 1,2-HOPOs. Das erwartete 3:1 Verhältnis von Ligand zu Metal wurde aus der Zunahme der Eduktsignale im 3:1 Spektrum identifiziert. Der Nebensignalsatz kann einer unbekannten Komplexgeometrie zugeordnet werden.

Die Tieffeldverschiebung der HOPO-Signale impliziert die Komplexierung des Metals. Bei 300 MHz und bei Raumtemperatur steht die komplexierte Spezies in einem langsamen Gleichgewicht mit ihrer unkomplexierten Form. Der isolierte trimere $\text{Ga}(\text{1,2-HOPO})_3$ -Komplex markiert den Endpunkt der Titration. Dessen Zusammensetzung wurde sowohl massenspektrometrisch als auch elementaranalytisch nachgewiesen. Bei der ersten Zugabe von 1,2-HOPO verschwindet das Signal der unkomplexierten Form (blau) komplett. Bei einem 2:1 Verhältnis von HOPO zu Ga^{3+} erscheint ein neuer Signalsatz (rot), welcher im 3:1 Spektrum sein Maximum findet, bevor das hinzugegebene 1,2-HOPO nahezu vollständig in den Signalsatz der unkomplexierten Form übergeht. Das Experiment wurde in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ wiederholt, wobei der daraus resultierende trimere $\text{Ga}(\text{1,2-HOPO})_3$ -Komplex aus der Lösung ausfiel, was die direkte Überleitung zu den Titrationsexperimenten mit Peptiden in Wasser darstellt.

4.11.3 Metallkomplexierende Peptide

Als Modellpeptid wurde die Sequenz des β -hairpin Peptids **P2** gewählt, wobei hier die Hop-Aminosäure an Position des Trp³ mutiert wurde. Durch den Einsatz der enantiomerenreinen Aminosäure Fmoc-L-Hop(*t*Bu)-OH **51** wird das entsprechende L-Hop-haltige Peptid **P29** erhalten. Beim Einsatz der racemischen Aminosäure Fmoc-DL-Hop(*t*Bu)-OH **50** können die beiden diastereomeren Peptide **P30** und **P31** nach Oxidation mittels präparativer HPLC getrennt werden, sodass auch das entsprechende D-Hop haltige-Peptid **P31** isoliert und charakterisiert werden kann. Da die Trp³ Seitenkette einen hydrophoben Kontakt mit Leu¹² δ -CH₃ eingeht, kann durch den Einbau der Pyridon-Aminosäure untersucht werden, inwiefern dieser deutlich elektronenärmere Aromat diese Wechselwirkung noch eingeht und damit die Sekundärstruktur stabilisiert bzw. destabilisiert. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde neben den beiden Isomeren der Pyridon-Aminosäure in den Peptiden **P32** und **P33** zusätzlich zwei Peptide synthetisiert, welche neben dem β -verzweigten β,β -L-Diphenylalanin **P32** (Dpa) und 1-L-Naphthylalanin **P33** (1-Nal) in der Trp³-Position trägt (Abbildung 4-48).

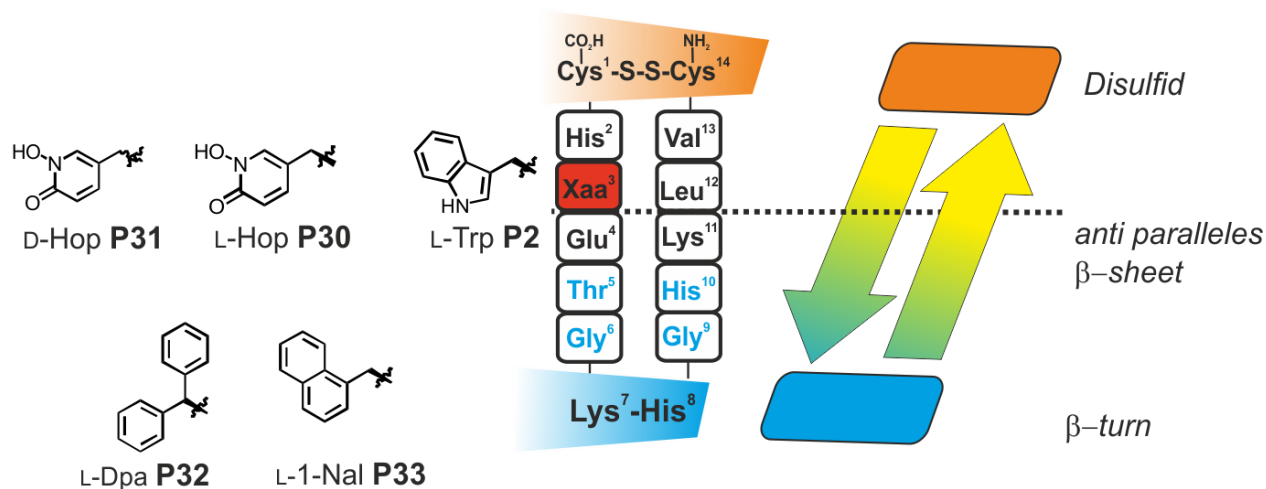


Abbildung 4-48: Synthese der Peptide **29-32** durch Einbau der entsprechenden Aminosäure an Position 3 der 14er Peptide.

Die NMR-Analyse zeigt, dass sowohl die amidische als auch die aliphatische Dispersion der Hop-haltigen Peptide deutlich reduziert ist im Gegensatz zum Trp³-Peptid **P2**. Der gegenteilige Effekt wird für das deutlich elektronenreichere L-1-Nal Peptid **P33** beobachtet. Die geringste Dispersion wird für das L-Dpa Peptid **P32** erhalten.

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Peptide sind in Abbildung 4-49 zusammengefasst.

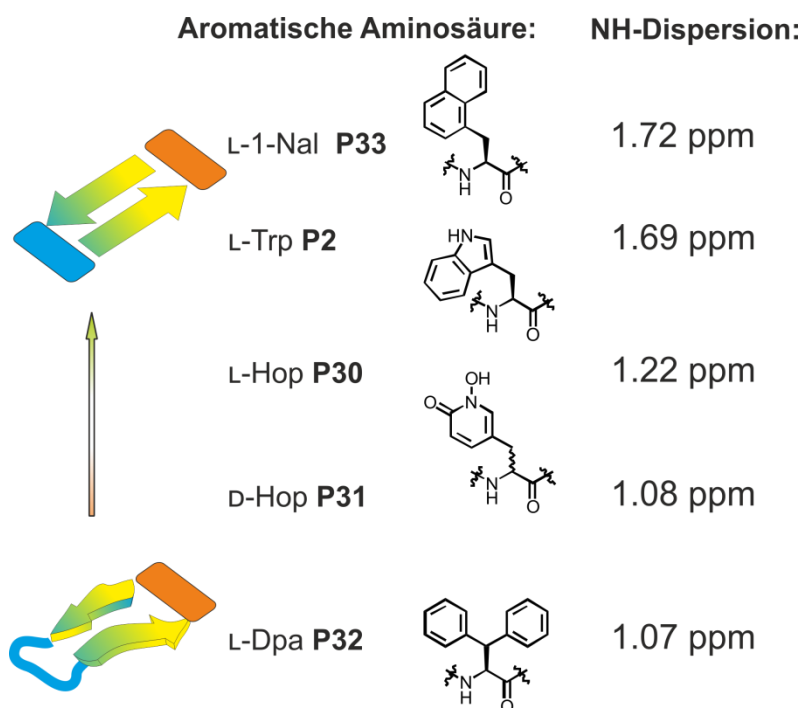


Abbildung 4-49: NMR-Analyse (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1) der Peptide mit Mutation in Position 3 des hydrophoben Clusters: Die Sekundärstruktur wird durch den deutlich elektronenärmeren Pyridon-Aromaten in den Peptiden **P30** bzw. **P31** reduziert, während das elektronenreiche 1-L-Nal die Struktur in **P33** festigt.

Um die Faltungspopulation in dieser Mutationsserie zu bestimmen, werden zwei Werte der chemischen Verschiebung des Tieffeld Leu¹² δ -CH₃ als Referenz gesetzt und die Population der Peptide wird relativ zu diesen beiden Werten bestimmt. Hierzu wurde der komplett entfaltete Zustand mit dem *random-coil* Wert nach *Wishart* charakterisiert, während die chemische Verschiebung der Methylgruppe im 1-L-Nal Peptid **P33** als komplett gefaltet angenommen wurde. Die daraus resultierenden Faltungspopulationen sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst und diese Werte bestätigen die deutlich verringerte Population in beiden Hop-Peptiden **P29** und **P30**. Um zu verifizieren, dass erst die Disulfid-Oxidation zur Faltung des Peptids führt, wurde die entsprechende reduzierte Form **P2a** von **P2** ebenso in Tabelle 4-3 erwähnt.

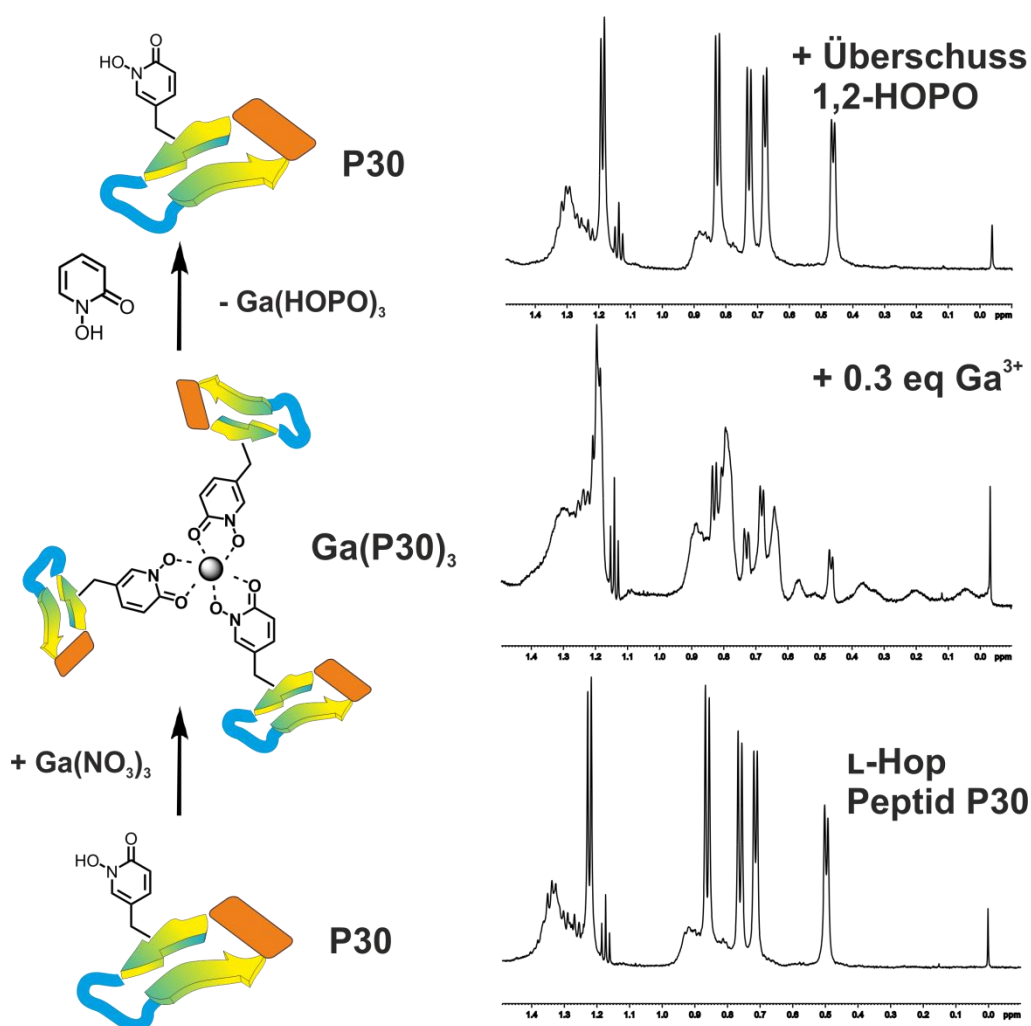
Tabelle 4-3: Sequenzen und Faltungspopulationen der Peptide **P2**, **P30-P33**: Als Referenzwerte dienen das 1-L-Nal Peptid**33**, sowie ein *random-coil* Wert nach *Wishart*.^[155]

Peptid	Sequenz	Faltungspopulation
P2a	H-CHTrpETGKHGHKLVC-OH	9%
P2	[dsb ^{1,14}]H-CHTrpETGKHGHKLVC-OH	88%
P30	[dsb ^{1,14}]H-CHHopETGKHGHKLVC-OH	31%
P31	[dsb ^{1,14}]H-CHhopETGKHGHKLVC-OH	18%
P32	[dsb ^{1,14}]H-CHDpaETGKHGHKLVC-OH	17%
P33	[dsb ^{1,14}]H-CHNalETGKHGHKLVC-OH	100%*

*) Referenzwert

Aus den in Tabelle 4-3 gezeigten Faltungspopulationen kann die Vorhersage bestätigt werden, dass die 6 π Elektronen Seitenkette des Hops zu klein ist, um den hydrophoben Cluster ausreichend zu stabilisieren, was in einer geringeren Faltungspopulation resultiert im Vergleich zum 1-L-Nal³-**P33** oder Trp³-**P2** haltigen Peptid. Um zu untersuchen, inwiefern die Metallkomplexierung des l-Hop Peptids **P30** sich auf die Faltungspopulation auswirkt, wurde dieses Peptid in wässriger Lösung (Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) auf NMR-Skala mit Ga(NO₃)₃ versetzt in Analogie zu den in Abbildung 4-47 durchgeführten Experimenten. Hierfür wird ein 3:1 Verhältnis von Ligand zu Metall gewählt, um die entsprechende Komplexgeometrie in Analogie zu den vorherigen Experimenten zu erhalten. Es kann eine klare Veränderung der Signale beobachtet werden, was die Metallkomplexierung in Analogie zum DMSO-Experiment bestätigt (Schema 4-8). Zusätzlich wird eine Signalverbreiterung beobachtet, welche durch die diastereomere Anordnung der Peptide um das Metall-Kation erklärt werden können. Wird das am stärksten, im Zuge der Metallkomplexierung, hochfeldverschobene Leu δ -CH₃ als Anhaltspunkt zur Quantifizierung der Population gewählt, so kann die Faltungspopulation der *hairpin*-Peptide auf 64% erhöht werden, wenn das hochfeldigste Leu δ -CH₃-Signal zur Berechnung genutzt wird. Um nachzuweisen, dass dieser Prozess durch die Metallkomplexierung der Hop-Seitenkette ausgeht und nicht durch His-Seitenketten in dieser His-reichen Sequenz, wurde das Trp³-Peptid **P2** in Analogie mit Ga(NO₃)₃ versetzt, wobei keinerlei Signalverschiebung oder Linienverbreiterung beobachtet werden konnte. Wird zum trimeren Ga-Komplex von Peptid **Ga(P30)₃**, ein stärkerer Metallchelator, hier 1,2-HOPO, hinzugegeben, so wird wieder das Original Spektrum des nicht komplexierten Peptids **P30** erhalten. Zusätzlich bildet sich ein weißer Niederschlag. Dieser wurde aufgereinigt und ebenfalls NMR-spektroskopisch untersucht, wobei für die aromatischen Signale des 1,2-

HOPOs identische chemische Verschiebungen wie zum trimeren $\text{Ga}(\text{HOPO})_3$ erhalten wurden. Da die NMR-Signale allerdings keinerlei Aussage über die relative Zusammensetzung des Komplexes zulassen, wurde dieser zusätzlich elementaranalytisch untersucht, wobei eindeutig das 3:1 Verhältnis verifiziert werden kann. Es kann durch dieses Experiment eindeutig bestätigt werden, dass es sich hierbei um einen reversiblen Prozess handelt, welcher zukünftig dazu genutzt werden kann, Aggregate in der Größenordnung von oligomeren Proteinen auf Basis von reversibler Chemie im wässrigen System zu synthetisieren.



Schema 4-8: Metallkomplexierung des L-Hop haltigen Peptids **P30**: Bei einem 3:1 Verhältnis von Peptid zu Ga^{3+} ist eine vollständige Sättigung in $\text{Ga}(\text{P30})_3$ erreicht. Die Linienverbreiterung resultiert aus der diastereotopen Anordnung der Peptide um das Metallatom. Durch Zugabe eines kompetitiven Metalchelators kann die Reversibilität des Prozesses nachgewiesen werden. Es wird das Originalspektrum von **P30** erhalten.

Die Ergebnisse dieser Metallkomplexierung konnten erfolgreich in *Chemistry – A European Journal* veröffentlicht werden.^[242]

5. Anwendung der Peptide in der Durchflusszytometrie

5.1 Anbringung eines Fluoreszenzmarkers am β -hairpin Peptid

Um das formstabile β -hairpin Peptid **P2** aktiv in der Durchflusszytometrie anzuwenden, wurde eine Synthesestrategie entwickelt, welche eine regioselektive Anbindung des Farbstoffes an das Peptid ermöglicht. Als Farbstoff dienen dabei fluoreszente Isothiocyanate, die durch eine Additionsreaktion an freien Aminen entsprechende Thioharnstoff-Derivate liefern. Die Struktur beider verwendeter Farbstoffe ist in Abbildung 5-1 gezeigt.

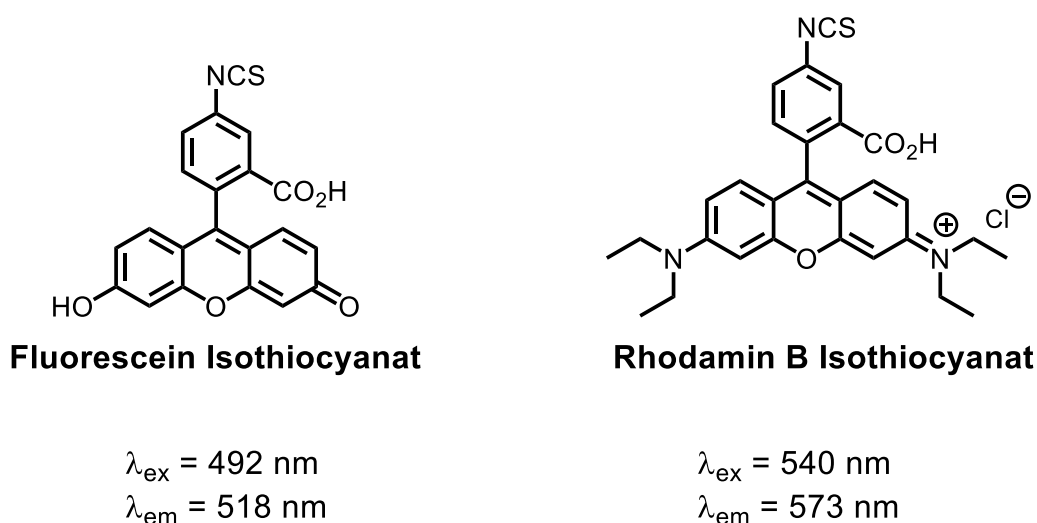
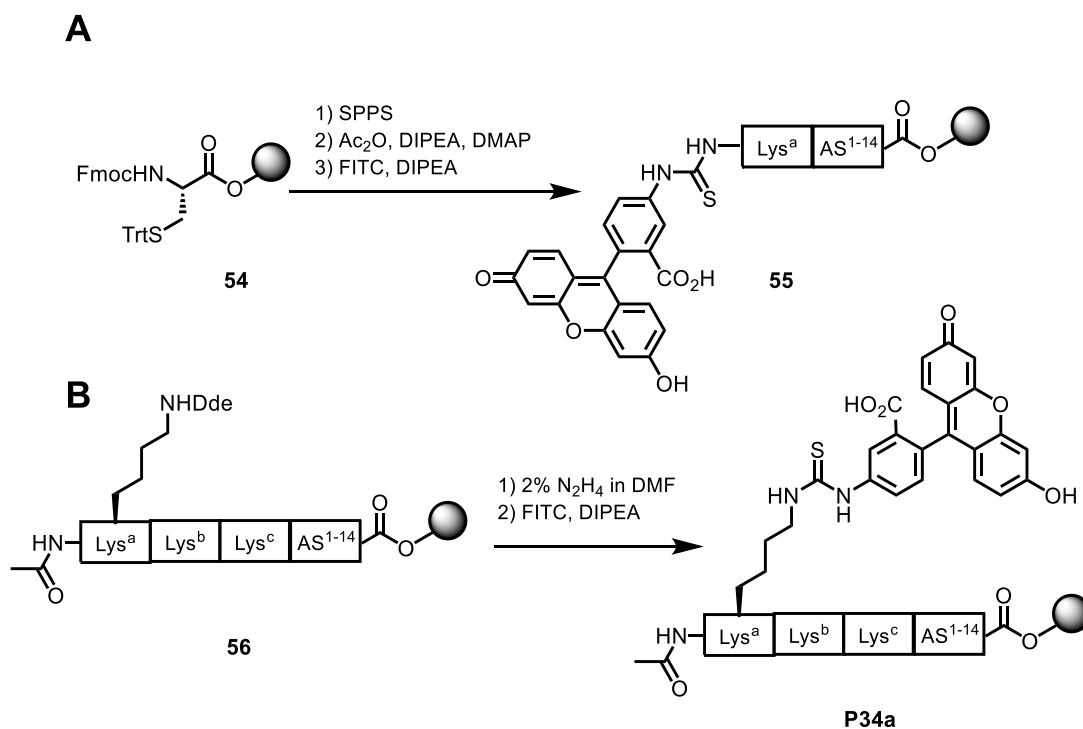


Abb 5.1: Struktur und Fluoreszenzeigenschaften der angewandten Farbstoffe.

Die Anbringung des Markers sollte dabei an der Festphase erfolgen, um die Markierung regioselektiv und möglichst effektiv durchführen zu können. Eine direkte Anbringung an den *N*-Terminus des Peptids zu **55** ist synthetisch problemlos möglich, jedoch resultiert das erhaltene Strukturmotiv des Thioharnstoffs bei der sauren Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger in Fragmentierung des Peptidrückgrats, analog zum *Edman*-Abbau.^[243] Daher wurde eine alternative Syntheseroute gewählt, bei der der Farbstoff an die Seitenkette eines *N*-terminalen L-Lysins gebunden wurde, um die *Edman*-Bedingungen zu vermeiden. Es wurden insgesamt drei *N*-terminale L-Lysin Einheiten angebracht, um eine Wechselwirkung des Farbstoffs mit dem Peptidrückgrat zu vermeiden, welche bei dem Einsatz von nur einer *N*-terminalen Lysin-Einheit beobachtet werden konnte. Im Detail wurde dazu zunächst das Peptid unter Standardbedingungen in der automatisierten Festphasenpeptidsynthese dargestellt. Das *N*-terminale L-Lysin wurde als Fmoc-L-Lys(Dde)-OH eingesetzt. Nach Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurde der *N*-Terminus acetyliert, um eine Nebenreaktion mit dem Farbstoff zu vermeiden. Mittels Hydrazinolyse erfolgte die

Abspaltung der Dde-Schutzgruppe, sodass am ϵ -Amin von Lys^a selektiv die Reaktion mit dem Farbstoff durchgeführt werden konnte. Abschließende Abspaltung des Peptids vom Harz, sowie Disulfid-Oxidation und Aufreinigung lieferten das fluoreszenzmarkierte Peptid **P34a**. Die entsprechende 14 Aminosäuren-haltige native Sequenz des eif5a-Peptids **P1** wurde analog mit Rhodamin B zu **P34b** fluoreszenzmarkiert, um Konkurrenz-Experimente durchführen zu können (Schema 5-1), da dieses Fluorophor bei einer anderen Wellenlänge absorbiert und emittiert.



Schema 5-1: Synthetischer Zugang zu den fluoreszenzmarkierten Peptiden **P34a** und **P34b**: Beide Methoden bringen den Farbstoffe an der Festphase an das Peptid an. **A:** Durch die Anbringung des Farbstoffs an den *N*-Terminus des Peptids **55** werden bei der sauren Abspaltung vom polymeren Träger *Edman*-Bedingungen geschaffen, die in der Fragmentierung des Peptids resultierten, weshalb eine alternative Route untersucht wurde. **B:** Es wurden *N*-terminal drei Lys-Einheiten angebracht, wobei das *N*-terminale Lys als Fmoc-L-Lys(Dde)-OH in der Synthese eingesetzt wurde. Acetylierung des *N*-Terminus, Hydrazinolyse der Dde-Schutzgruppe und die anschließende Anbringung des Farbstoffs an das ϵ -Amin von Lys^a **56**, resultierten nach saurer Harzabspaltung in den fluoreszenzmarkierten Peptiden **P34a** und **P34b**.

Durch NMR spektroskopische Analyse der beiden erhaltenen Peptide konnte nach Aufreinigung der Umsatz des Labellings beider Peptide auf ca. 40% geschätzt werden. Abbildung 5-3 fasst die Strukturen der beiden fluoreszenzmarkierten Peptide zusammen.

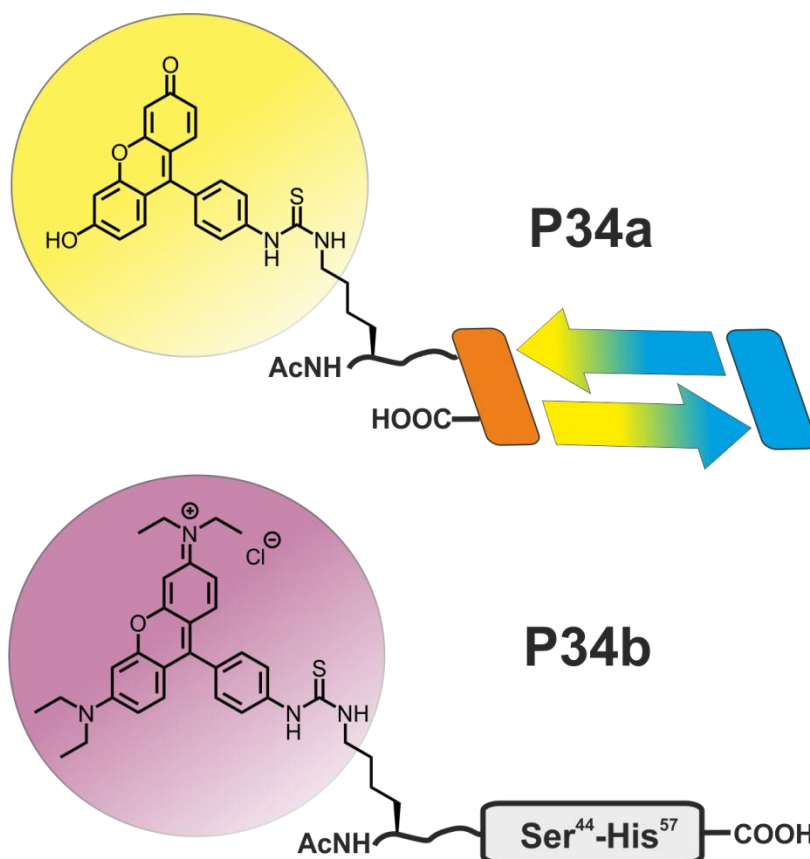


Abbildung 5-3: Strukturen der synthetisierten, fluoreszenzmarkierten Peptide **P34a** und **P34b**.

5.2 Fluoreszenz markierte Peptide im Jurkat 2D10 HIV-System

Das Peptid **P34a** wurde im Jurkat 2D10 HIV-System auf ihre Zellgängigkeit, Zytotoxizität und ihre Apoptose-induzierende Wirkung untersucht. Das angewandte System entspricht den bereits im Kapitel 3 beschriebenen Bedingungen, wobei hier ausschließlich die E6-Zelllinie verwendet wurde, da die Verwendung der 2D10-Zelllinie keine Differenzierung zwischen der Emission des FITC-Labels und der der GFP-modifizierten Zellen zulassen würde. Die Zellen wurden zusätzlich dreifach mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS: *engl. phosphate buffered saline*) gewaschen, um keine Emission zu detektieren, welche lediglich von gelöstem, nicht mit der Zelle assoziiertem Peptid stammt. Die experimentelle Durchführung ist in Abbildung 5-4 dargestellt.^[244]

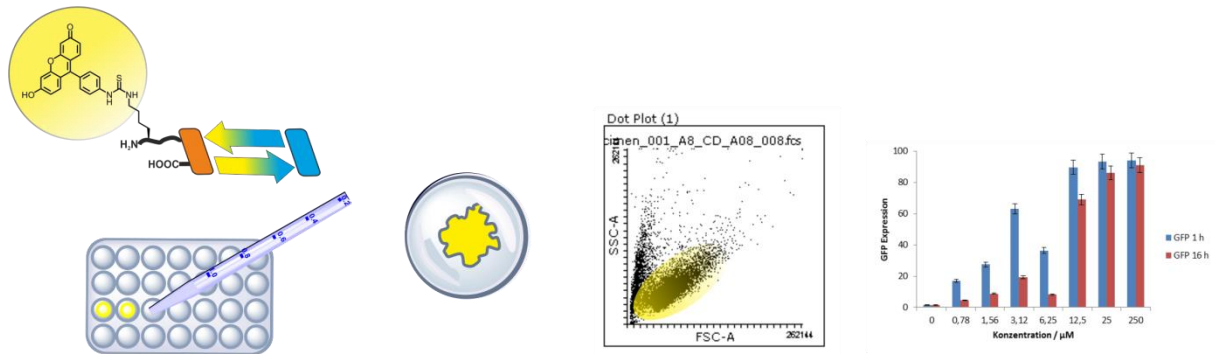


Abbildung 5-4: Schematische Darstellung des Durchflusszytometrie Experiments mit Peptid **P34a**: Jurkat E6-Zellen (30.000 Zellen/well, 200 µL) wurde für eine bzw. 16 Stunden mit dem FITC-markierten Peptid **P34a** inkubiert. Nach dreifachem Waschen mit PBS wurden die Zellen ins Medium resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Das auf dem GFP-Kanal gemessene Signal entspricht der FITC-Emission, da Absorption und Emission bei ähnlichen Wellenlängen erfolgen, sodass eine Aussage über die Aufnahme des Peptids in E6-Zellen getroffen werden konnte.

Aus dem entsprechenden Histogramm der FITC-Emission wurden P1-Viabilität und %GFP quantifiziert. Es wurden zwei Experimente durchgeführt, wobei eine und 16 Stunden bei identischen Konzentrationen inkubiert wurde. Die Auftragung der P1-Viabilität ist in Abbildung 5-5 gezeigt.

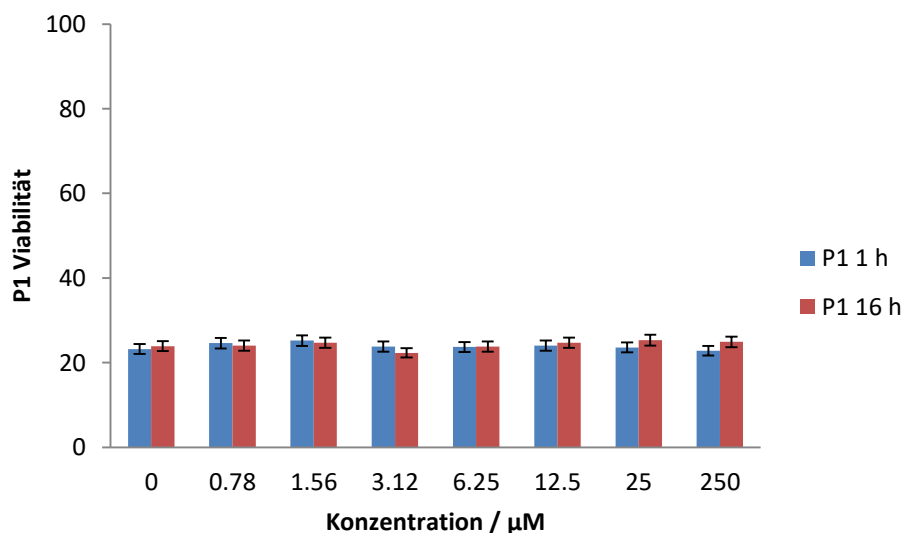


Abbildung 5-5: P1 Viabilität der Jurkat E6-Zellen, die mit Peptid **P34** bei entsprechenden Konzentrationen eine bzw. 16 Stunde behandelt wurde. Es ist keine Zytotoxizität erkennbar. Auch keine apoptotische Wirkung kann erkannt werden.

Abbildung 5-6 zeigt deutlich, dass die Viabilität unabhängig von der angewandten Peptidkonzentration ist. Auch ist keine Zeitabhängigkeit feststellbar.

Das Peptid P34 wirkt also in diesem Zellsystem weder zytotoxisch, noch hat es eine apoptotische bzw. Apoptose-induzierende Wirkung. Abbildung 5-6 zeigt die gemessene %FITC-Emission dieses Experiments.

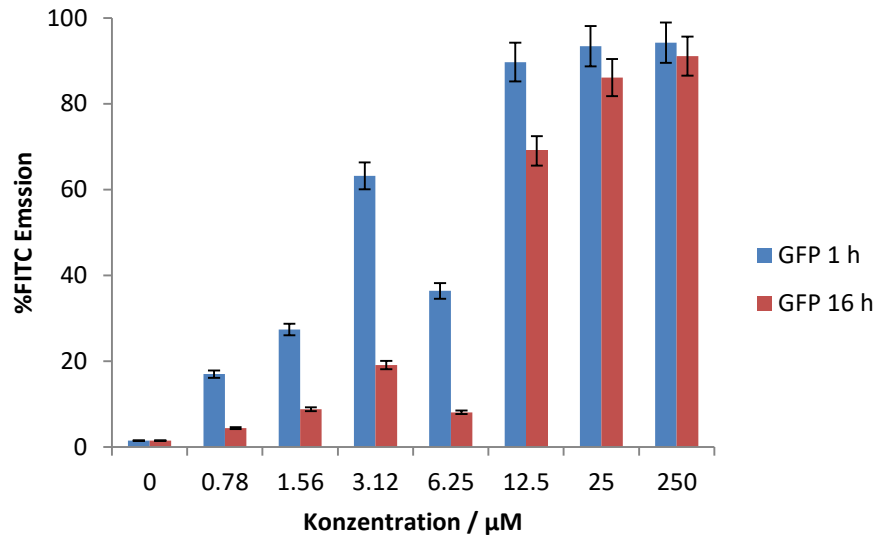


Abbildung 5-6: %FITC Emission der Jurkat E6-Zellen, die mit Peptid **P34a** behandelt wurden. Im niedrigen Konzentrationsbereich ist eine deutliche Zeit- sowie Dosisabhängigkeit zu erkennen, wobei dieser Effekt mit steigender Konzentration deutlich reduziert wird.

Es wird deutlich, dass im niedrigen Konzentrationsbereich die FITC-Emission stark dosis- und zeitabhängig ist. Dieser Effekt wird beim Überschreiten der 12.5 μM Konzentration geringer. Eine stressinduzierte Reaktion der Zellen kann bei 3.12 μM beobachtet werden. Dieses Experiment verdeutlicht, dass das Peptid **P34a** in diesem Zellsystem eine sehr spezifische Reaktion hervorruft, die unter Umständen auf eine Veränderung der Zellstruktur bzw. des Zytoskeletts zurückzuführen ist. Daher wurde aus den Fluoreszenz-Daten dieses Experiments die gemittelte Fluoreszenz-Intensität extrapoliert, um eine Konzentration zu finden, bei welcher konfokale Mikroskopie mit dem FITC-markierten Peptid **P34a** durchgeführt werden konnte. Die Auftragung der gemittelten Fluoreszenz-Intensität dieses Experiments ist in Abbildung 5-7 gezeigt.

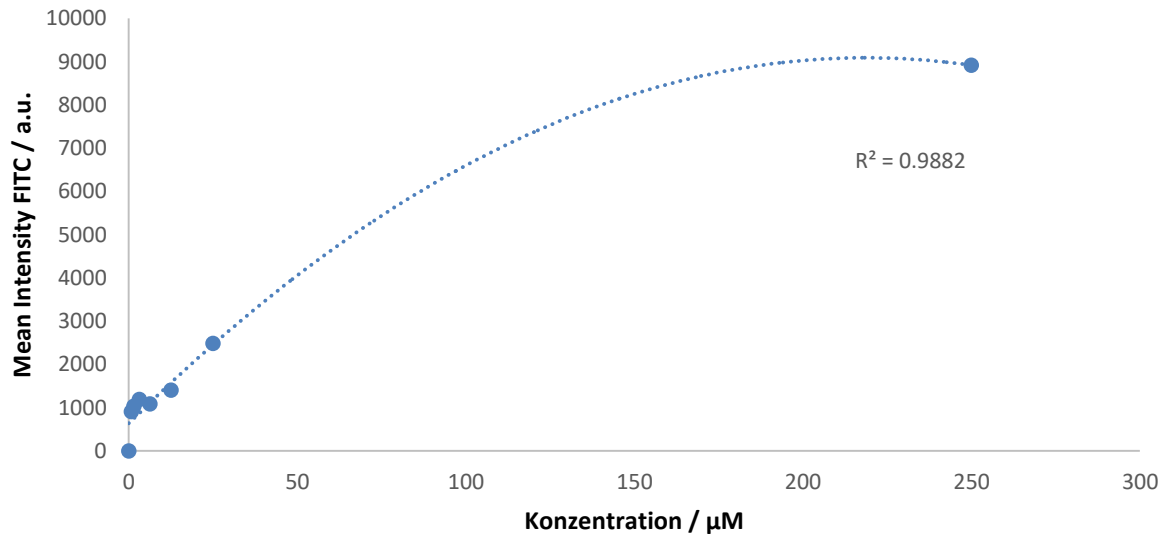


Abbildung 5-7: Auftragung der extrapolierten, gemittelten Fluoreszenz-Intensität gegen die Konzentration im Durchflusszytometrie Experiment von Peptid **P34a** an Jurkat E6-Zellen (a.u. *absorption units*).

Da die konfokale Mikroskopie eine mittlere Fluoreszenz-Intensität von ca. 4000 *a.u.* erfordert, um ein ausreichendes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zu gewährleisten, wurde eine Konzentration von 100 μM zur Durchführung der Mikroskopie gewählt.

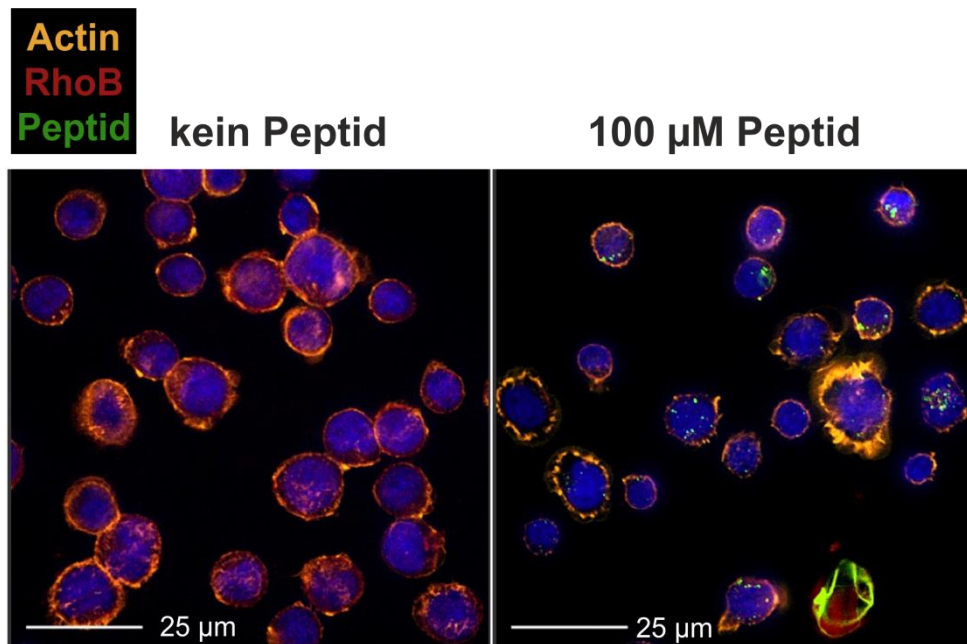


Abbildung 5-9: Konfokal-mikroskopische Aufnahmen der E6-Zellen bei Behandlung mit Peptid **P34a** (rechts) im Vergleich zur Blank-Messung (links).

In Abbildung 5-9 wird deutlich, dass das Peptidsignal breit durch das Zytoplasma verteilt ist. Einige Zellen zeigen perinukleare Anordnung des FITC-Signals, eine disperse Verteilung ist erkennbar. RhoB färbt frühe Endosomen/Actomyosin-Strukturen und damit die kontrollierte Zellbewegung an. Dieses Signal ist prominent in der Blank-Messung, jedoch wird dieses deutlich reduziert bei Behandlung der Zellen mit Peptid **P34a**. Analoge Beobachtungen können für die Anfärbung des Actins mit dem Rab7-Antikörper gefunden werden. Abbildung 5-10 zeigt die identischen Aufnahmen aus Abbildung 5-9, wobei hier ausschließlich die beiden Antikörper-Anfärbungen (Rab7 und RhoB) gezeigt sind.

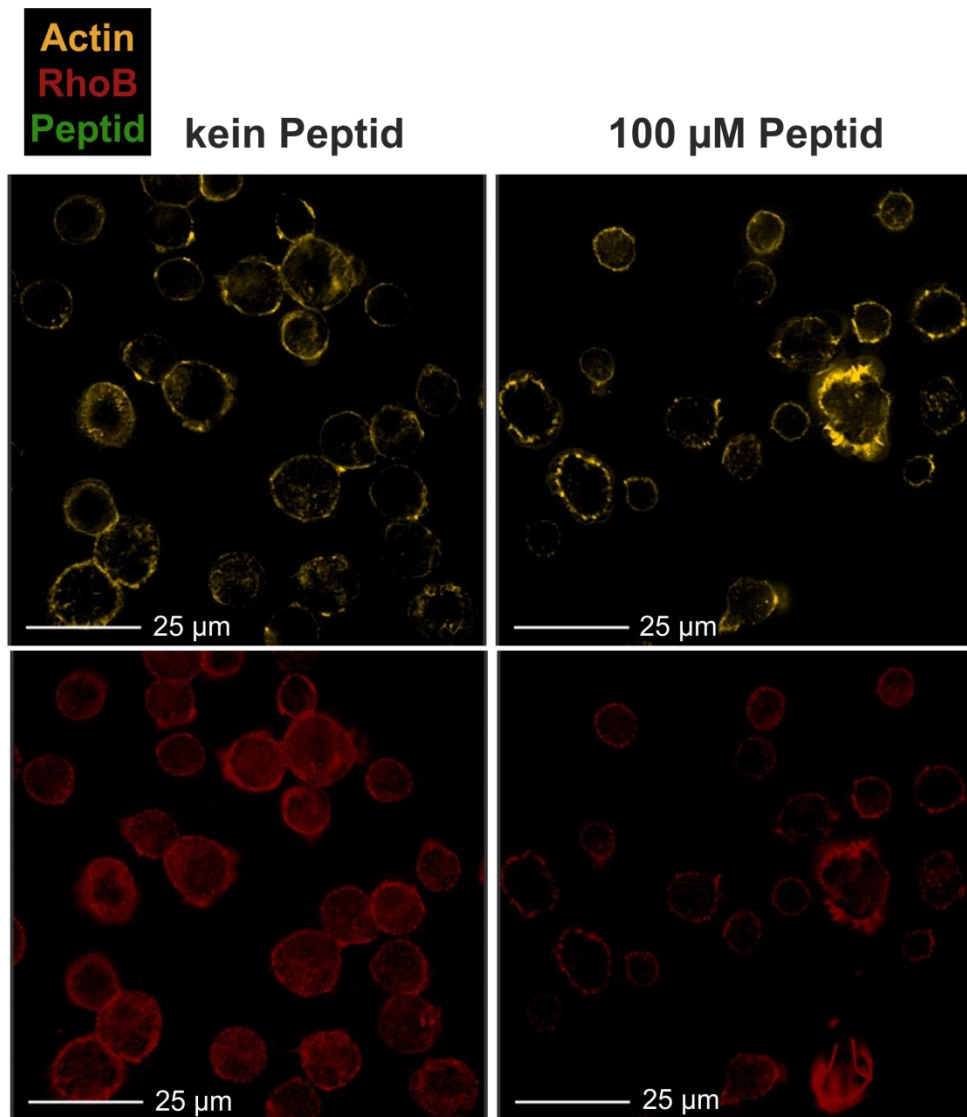


Abbildung 5-10: Konfokal-mikroskopische Aufnahme der E6-Zellen bei Behandlung mit Peptid **P34a** (rechts) im Vergleich zur Blank-Messung (links): Gezeigt sind ausschließlich die entsprechenden Antikörper-Anfärbungen. Oben: Rab7-Antikörper, welcher späte Endosomen und Lysosomen markiert. Unten: RhoB zur Markierung von frühen Endosomen und Actomyosin-Strukturen. In beiden Fällen ist eine deutliche Reaktion des Zytoskeletts auf die Behandlung mit Peptid **P34a** erkennbar. Actin ist in der Blank-Messung linear entlang der Membran verteilt, während es in der Peptid-Probe fokal höher verteilt ist. RhoB zeigt in der Referenzmessung eine gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma, während es bei Behandlung mit dem Peptid eine deutliche periphere Actin-Akkumulation zeigt.

In den Abbildungen 5-10 und 5-11 ist für Actin eine punktuelle Akkumulation entlang des Zytoskeletts erkennbar. Auch RhoB zeigt eine deutliche Änderung von einer gleichmäßigen, zytoplasmatischen Verteilung in der Referenzmessung zur einen ebenso punktuellen Anreicherung entlang der Zellmembran.

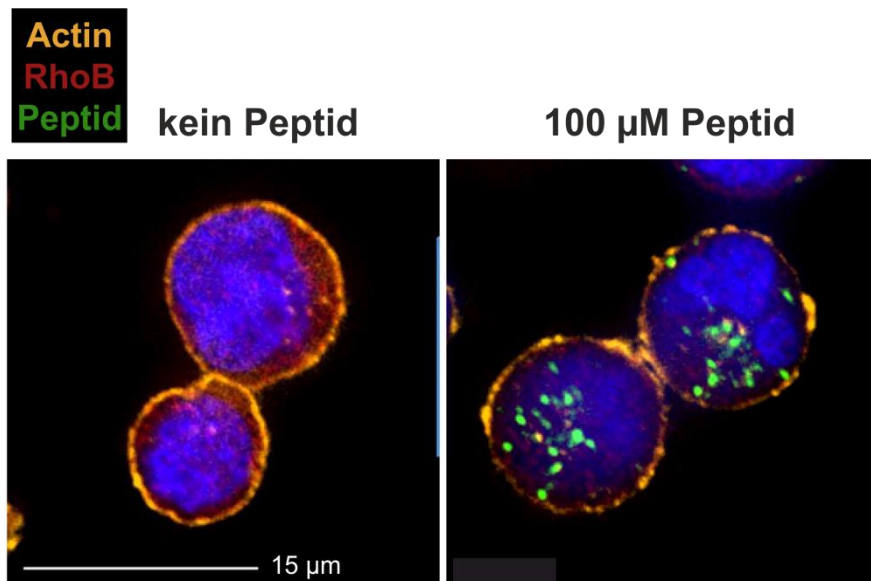


Abbildung 5-11: Vergrößerung einer konfokal-mikroskopischen Aufnahme des Experiments: Die punktuelle Akkumulation von Actin und RhoB entlang der Zellmembran ist deutlich erkennbar.

Auch ein Nanotransfer von Peptid **P34a** zwischen zwei Zellen konnte mikroskopisch beobachtet werden, was in Abbildung 5-12 verdeutlicht ist.

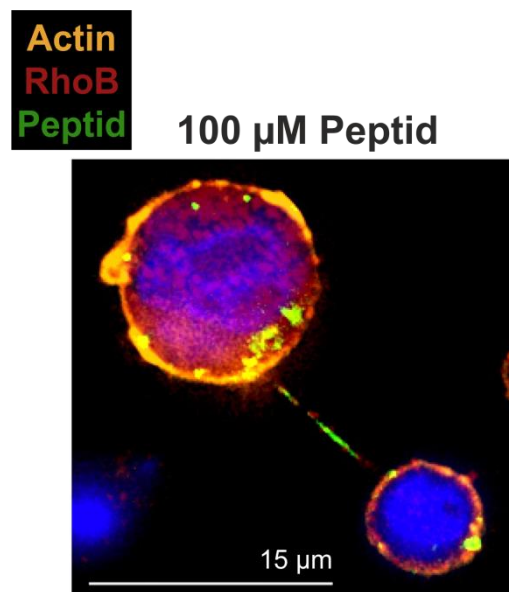


Abbildung 5-12: Nanotransfer von Peptid **34a** zwischen zwei Zellen: In der kleinen Zelle ist die bereits beschriebene Änderung des Zytoskeletts und die Umverteilung von RhoB deutlich erkennbar, während die große Zelle noch ihre ursprüngliche Form aufzeigt, welche mit der Referenzmessung übereinstimmt.

Eine apoptotische Wirkung des Peptids konnte mikroskopisch nicht identifiziert werden. Die Änderung in der Zellstruktur zeigt jedoch, dass die Inkubation mit dem Peptid eine spezifische Reaktion an den Jurkat E6-Zellen hervorruft. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den von *Seko et al.* publizierten Daten, dass extrazelluläres eIF5a als parakriner

Verstärker von Apoptose wirkt.^[80] Die Autoren beschreiben, dass dieser Effekt unabhängig von der posttranslationalen Modifikation von Lys⁵⁰ (entspricht Lys⁷ im Peptid **P2** bzw. **P34a**) ist. Das in diesem Experiment angewandte Peptid **P34a** ist unmodifiziert, die Seitenkette von Lys⁷ ist also weder aminobutyliert noch hydroxyliert. Eine Aussage, ob das verwendete Peptid selbst innerhalb der Zellen posttranslational modifiziert wird, kann anhand der vorliegenden Daten nicht getroffen werden. Hierfür wäre ein Radioimmunassay nötig, bei welchem entweder das Peptid selbst oder radioaktiv markiertes Spermidin ins Zellmedium gegeben wird. Nach Waschen der Zellen und Trypsinierung könnte die gemessene Radioaktivität einen Aufschluss darüber geben, inwiefern das Peptid selbst modifiziert wird.^[42] Auch sind die hier gezeigten Ergebnisse im Einklang mit der Hypothese, dass pathogene Zellen über einen eif5a-selektiven Rezeptor verfügen. Inwiefern die Aufnahme des Peptids über Makropinozytose oder Phagozytose erfolgt, kann nicht eindeutig bestimmt werden. Die selektiven Änderungen im Zytoskelett lassen eine Pinozytose vermuten, eine punktuelle Verteilung des Peptids in den Zellen ist für eine unspezifische Phagozytose selten zu finden. Eine Anfärbung mit einem Clathrin-spezifischen Antikörper könnte zukünftig Aufschluss darüber geben.^[245] Basierend auf diesen Beobachtungen wurde das fluoreszenzmarkierte Peptid **P34a** in weiteren Durchflusszytometrie Experimenten an mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*engl. peripheral blood mononuclear cells – PBMC*) angewandt. Diese Zellen nehmen eine bedeutende Rolle im Immunsystem bei der Bekämpfung von Infektionen ein. Unter dem Begriff der PBMCs werden einkernige Zellen bezeichnet, die einen runden Zellkern aufweisen. Die durchgeführten Experimente werden nachfolgend diskutiert.

5.4 Durchflusszytometrie mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes

In diesem Experiment wurden frisch aus menschlichem, venösem Blut isolierte PBMCs mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid **P34a** inkubiert. Fokus lag dabei auf T- und B-Zellen sowie Monozyten/Makrophagen. Zeit- als auch Dosisabhängigkeiten wurden untersucht. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 5-13 schematisch dargestellt.

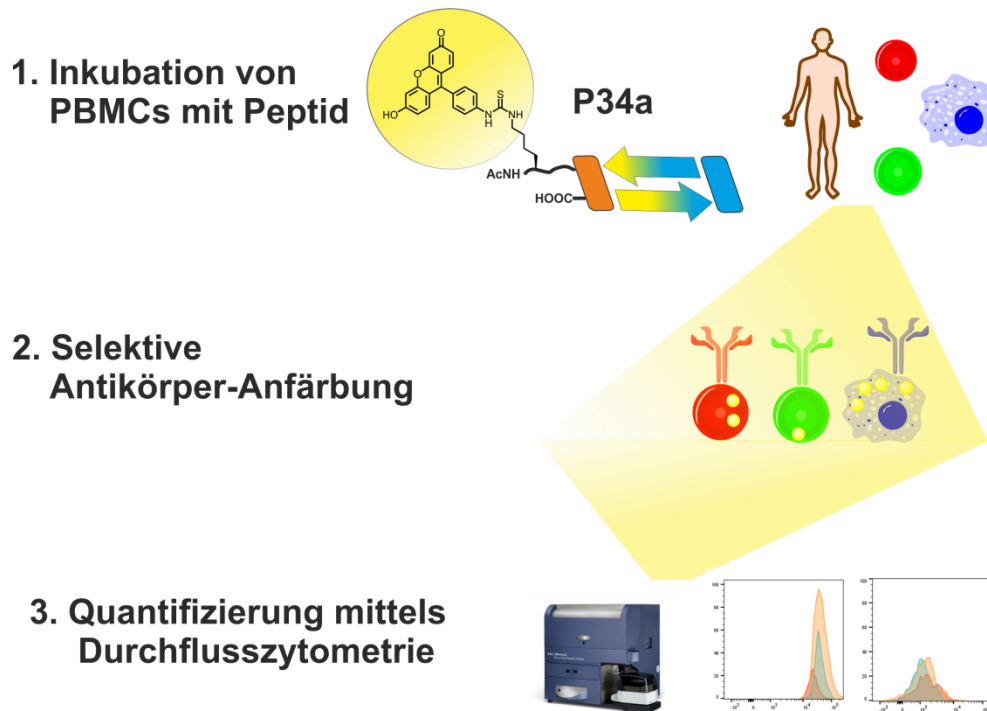


Abbildung 5-13: Durchführung der PBMC-Experimente: Frisch isolierte PBMCs aus humanem, venösem Blut wurden mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid **P34a** für eine bestimmte Zeit inkubiert. Durch selektive Antikörper-Anfärbungen der drei Zelltypen können diese mittels Durchflusszytometrie in einem Eintopf-Verfahren voneinander unterschieden werden ohne zusätzliche Auftrennung. Eine Quantifizierung der Peptidaufnahme ist für alle Zelltypen gleichzeitig möglich.

In einem Eintopf-Verfahren wurden die PBMCs mit variablen Konzentrationen des Peptids **P34a** (1-100 μM) behandelt und inkubiert. Nach Inkubation und Waschen der PBMCs wurden die untersuchten Zelltypen mit einem selektiven Antikörper angefärbt. Durch die unterschiedlichen Emissionen der verwendeten Antikörper können die drei Zelltypen mittels Durchflusszytometrie unterschieden werden, ohne dass eine Auftrennung der Zellarten notwendig ist. Die Anlagerung bzw. Aufnahme des fluoreszenzmarkierten Peptids **P34a**

kann dadurch für jeden Zelltyp quantifiziert werden.

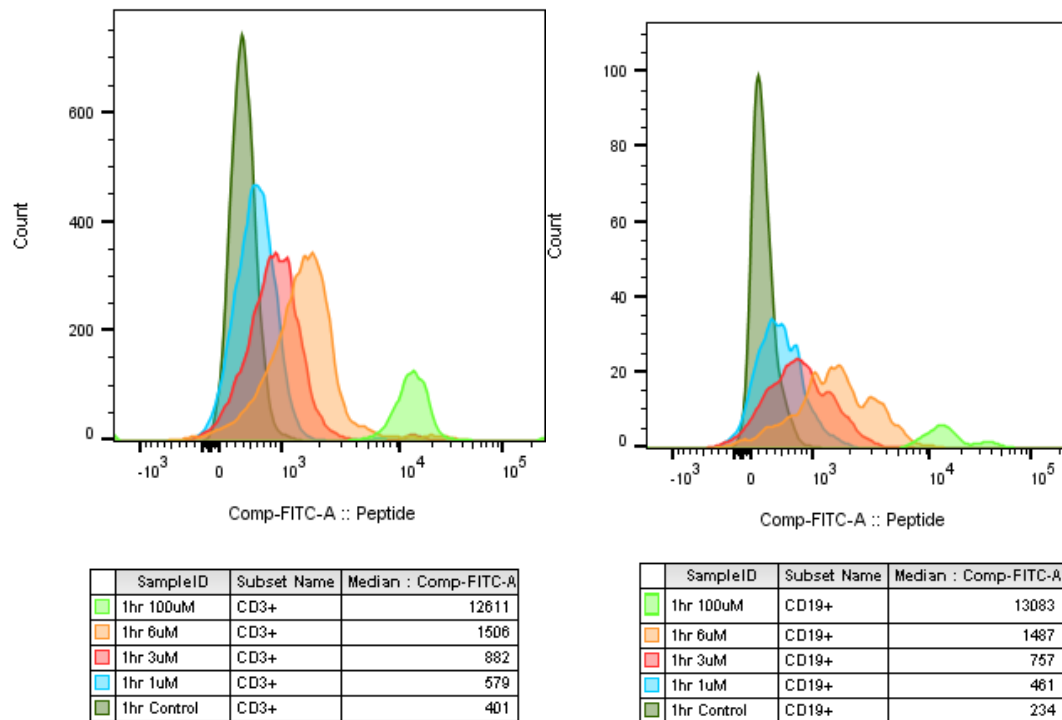


Abbildung 5-14: Auftragung der jeweiligen Zell-Counts gegen die logarithmische Auftragung der FITC-Intensität für T-Zellen (links, CD3+) und B-Zellen (rechts, CD19+). Es ist in beiden Fällen eine deutliche Dosisabhängigkeit der Aufnahme zu sehen.

Abbildung 5-14 zeigt eine Dosisabhängigkeit der Aufnahme für T- und B-Zellen, wobei die Aufnahme in T-Zellen etwas größer ist im Vergleich zu den B-Zellen (unterschiedliche Skalierung y-Achse). Bei den Monozyten/Makrophagen ist eine noch deutlichere Steigerung in der Aufnahme sichtbar, die die messbare Intensität des Instruments übersteigt. Die Auftragung ist in Abbildung 5-15 gezeigt.

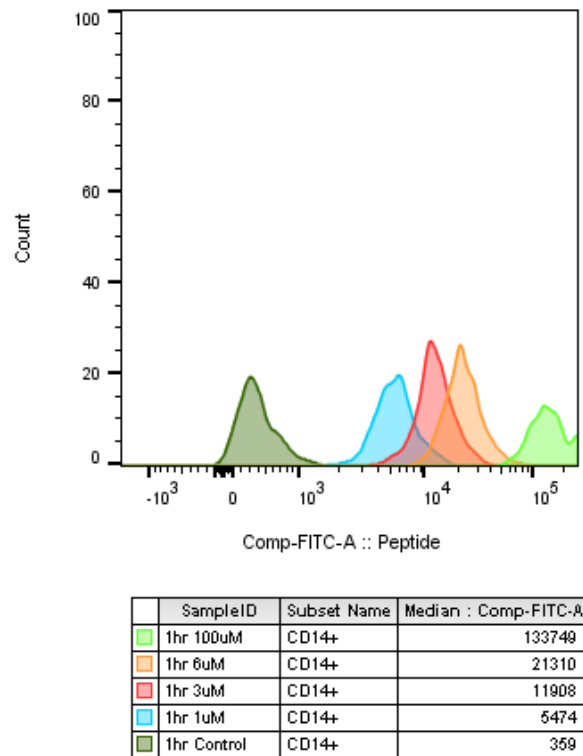


Abbildung 5-15: Auftragung der jeweiligen Zell-Counts gegen die logarithmische Auftragung der FITC-Intensität für Monozyten/Makrophagen (CD14+). Die FITC-Intensität übersteigt hier das Messlimit des Instruments.

Aus den Graphen der Abbildungen 5-14 und 5-15 kann die FITC-Intensität ausgelesen und gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen werden. Diese Auftragung ist in Abbildung 5-16 gezeigt.

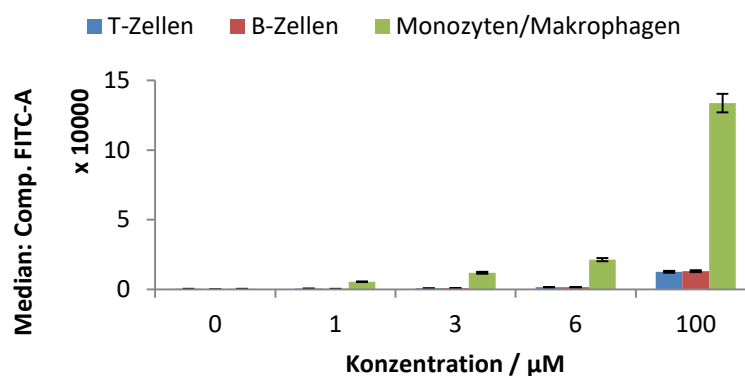


Abbildung 5-16: Auftragung der FITC-Intensität gegen die Konzentration für alle drei untersuchten Zelltypen. Es wird die intensive Aufnahme des Peptids **P34a** in den Monozyten/Makrophagen deutlich.

Bei der Untersuchung der zeitabhängigen Aufnahme des Peptids **P34a** wird deutlich, dass T-Zellen das Peptid in etwa zehnfach stärker aufnehmen als B-Zellen. Diese Aufnahme ist in beiden Zelltypen weitgehend zeitunabhängig. Wird angenommen, dass an den Zellen ein eif5a-selektiver Rezeptor vorhanden ist, so kann vermutet werden, dass dieser in dem gemessenen Zeitfenster nicht schnell genug nachsynthetisiert werden kann. Für Monozyten/Makrophagen hingegen wird eine deutliche Zeitabhängigkeit beobachtet, die erneut an der messbaren Grenze der Intensität liegt.

Die Zytogramme sind für T-Zellen und Monozyten/Makrophagen in Abbildung 5-17 gezeigt.

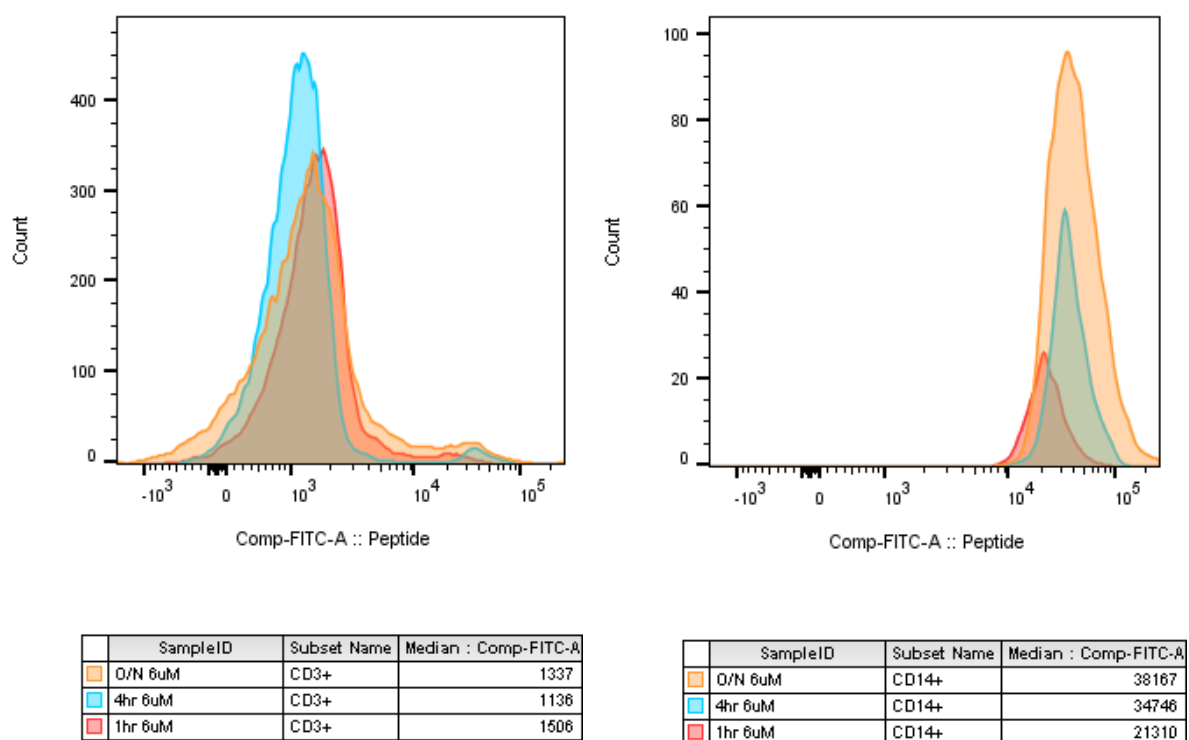


Abbildung 5-17: Zytogramme für T-Zellen (links, CD3+) und Monozyten/Makrophagen (rechts, CD14+). Die Zeitabhängigkeit der Aufnahme in den Monozyten/Makrophagen ist deutlich erkennbar und am Limit des Messinstruments. B-Zellen zeigen identischen Phänotypen zu den T-Zellen, daher ist dieser Chromatogram nicht gezeigt.

Es wird deutlich, dass das Peptid **P34a** bevorzugt an die Monozyten/Makrophagen bindet bzw. von diesen aufgenommen wird, was über die Dosis- als auch über die Zeitabhängigkeit der Aufnahme bestätigt werden kann. Abbildung 5-18 quantifiziert die zeitabhängige Aufnahme des Peptids **P34a**.

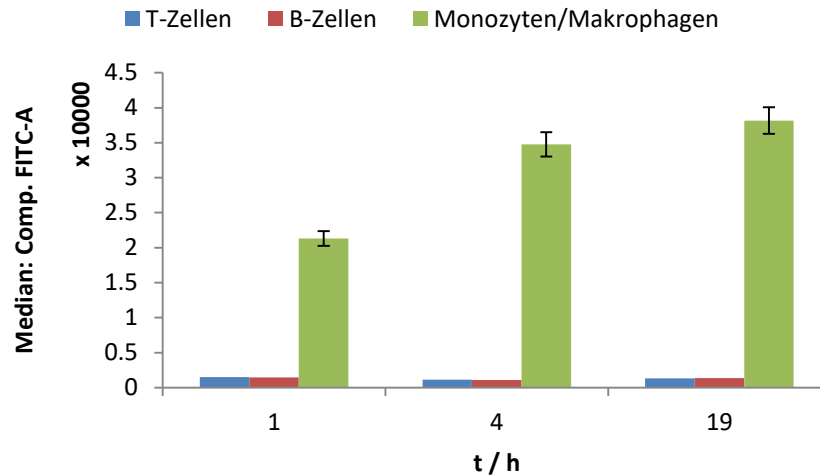


Abbildung 5-18: Auftragung der FITC-Intensität gegen die Zeit: Die Aufnahme in T- sowie B-Zellen zeigt keine Zeitabhängigkeit, während die Aufnahme in Monozyten/Makrophagen deutlich zeitabhängig ist.

Das Peptid **P34a** verfügt also über ein selektives Erkennungsmotiv für den phagozytischen Aufnahmeprozess in Monozyten/Makrophagen. Basierend auf der Arbeit von *Seko et al.* sollte das Peptid selbst aber keinerlei Apoptose induzieren, sondern nur extrazellulärer als parakriner Verstärker von Apoptose dienen.^[80] Diese Beobachtung konnte in einem Experiment bestätigt werden, in dem apoptotische Zellen mit einem Annexin V-Antikörper angefärbt wurden. Die entsprechenden Zytogramme sind in den Abbildungen 5-19 und 5-20 gezeigt.

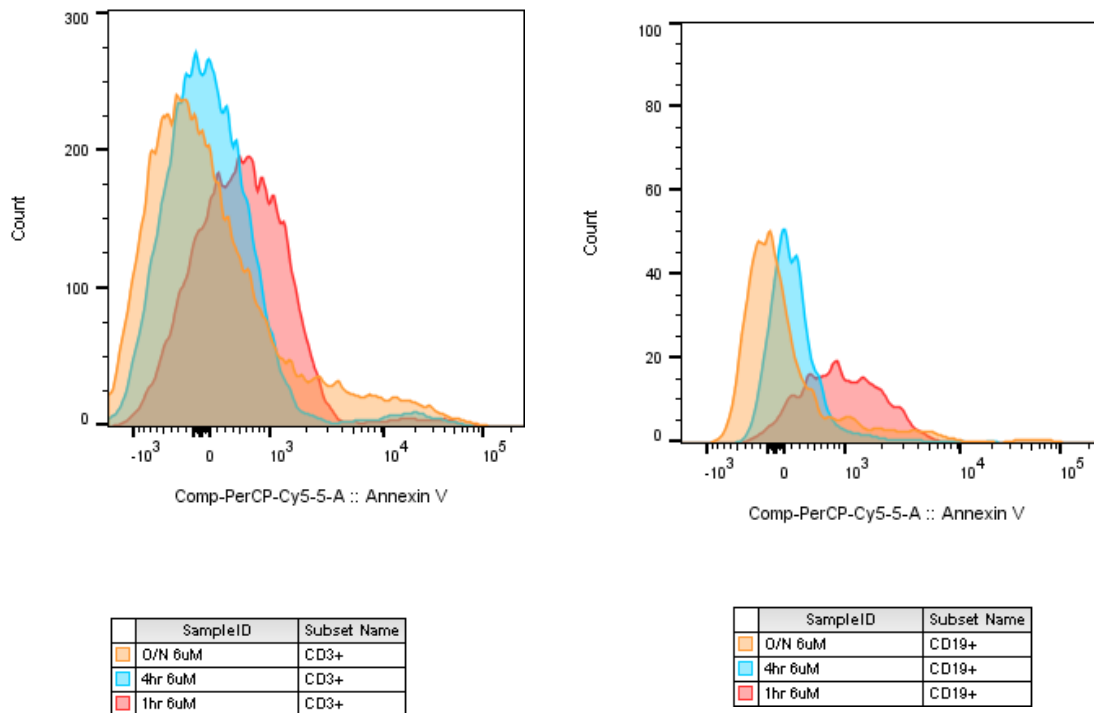


Abbildung 5-19: Auftragung der Zell-Counts gegen die logarithmische Annexin V-Intensität für T-Zellen (links, CD3+) und B-Zellen (rechts, CD19+): Es ist keine apoptotische Wirkung bei Behandlung der Zellen mit dem Peptid **P34a** erkennbar.

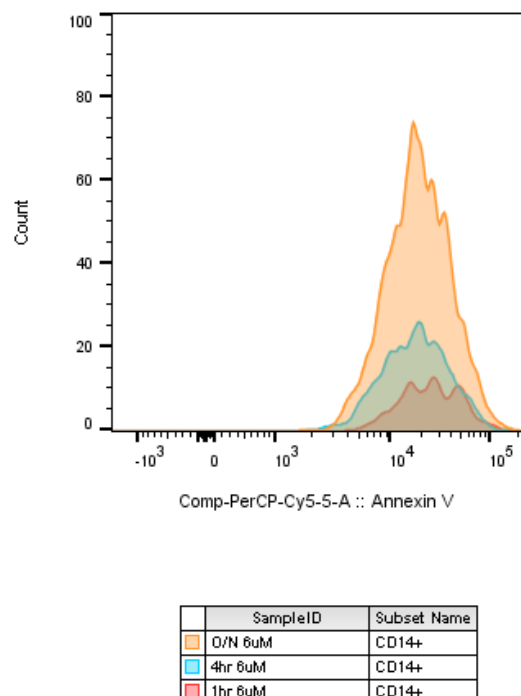


Abbildung 5-20: Auftragung der Zell-Counts gegen die logarithmische Annexin V-Intensität für Monozyten/Makrophagen (CD14+): Es ist keine apoptotische Wirkung bei Behandlung der Zellen mit dem Peptid **P34a** erkennbar.

Bei Auftragung der Annexin V-Intensität gegen die FITC-Intensität im Falle der T- und B-Zellen, ergibt sich eine interessante Beobachtung: Aus dem Prozess der Isolation der PBMCs wird ein kleiner prozentualer Anteil der T-Zellen spontan apoptotisch, welche sich in Abbildung 5-21 durch einen hohen Wert auf der Annexin V-Skala kennzeichnen. Bei der Zugabe des Peptids in den entsprechenden Konzentrationen, analog zu den Studien zur dosis- und zeitabhängigen Aufnahme des Peptids, wird eine deutliche Verschiebung dieser Zellpopulation entlang der FITC-Skala beobachtet (rot markiert in Abbildung 5-21). Dies bedeutet, dass das Peptid sehr stark an die spontan apoptotischen T-Zellen bindet, was im Einklang mit den Erkenntnissen von *Seko et al.* steht.^[80] Das Peptid selbst induziert keine Apoptose (vgl. Abbildung 5-6).

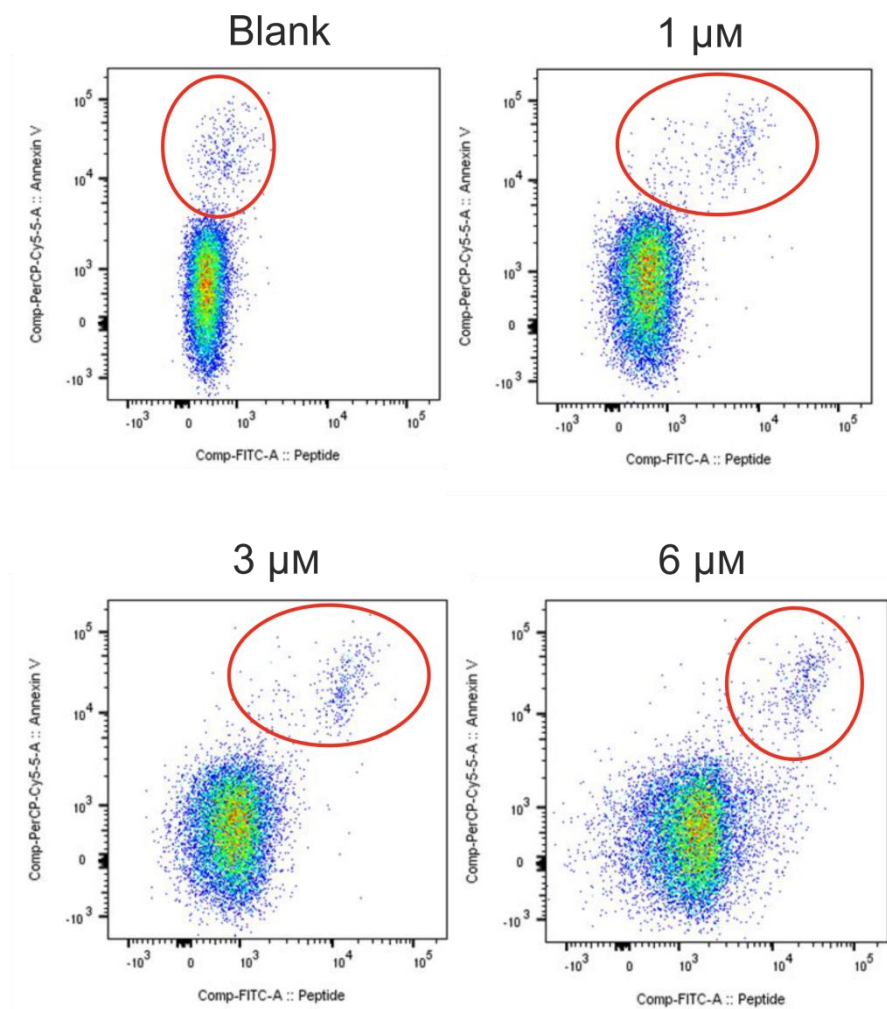


Abbildung 5-21: Logarithmische Auftragung der Annexin V-Intensität gegen die logarithmische FITC-Intensität für T-Zellen: Bei Zugabe des FITC-Peptids **P34a** wandert die Subpopulation der spontan apoptotischen T-Zellen entlang der x-Achse, was eine Bindung des Peptids an diese Population verdeutlicht (rot).

Als Kontrolle wurde mit den B-Zellen analog vorgegangen. Bei diesen Zellen existiert keine spontan apoptotische Subpopulation, die gesunden B-Zellen zeigen ein nahezu identisches Profil zu den T-Zellen. Es kann somit von einem T-Zell-spezifischem Effekt ausgegangen werden. Die Auftragung von Annexin V gegen FITC für B-Zellen ist in Abbildung 5-22 gezeigt.

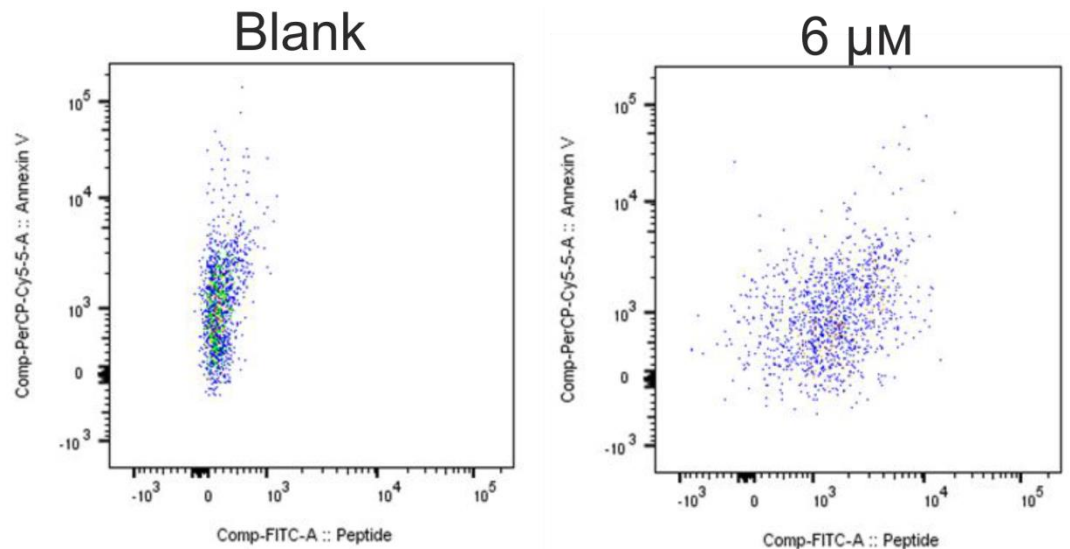


Abbildung 5-22: Logarithmische Auftragung der Annexin V-Intensität gegen die logarithmische FITC-Intensität für B-Zellen: Es ist keine spontan apoptotische Subpopulation erkennbar, das Streuungsmuster ist identisch zu dem Verhalten der T-Zellen in Abbildung 5-21.

Im Rahmen dieser Messung konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Peptide der Struktur **P2** bzw. **P34a** eine hohe Affinität gegenüber Monozyten aufzeigen und zusätzlich als parakriner Verstärker von Apoptose bei spontan-apoptotischen T-Zellen wirken. Um zu bestätigen, dass diese Beobachtung von der Sekundärstruktur des β -*hairpin* Peptids ausgeht, wurden im nächsten Abschnitt Konkurrenzexperimente durchgeführt, bei welchen unter den hier angewandten Bedingungen zusätzlich das nicht fluoreszenzmarkierte Peptid **P2** bzw. das unstrukturierte eif5a-Fragment **P1** zugegeben wurden.

5.5 Konkurrenzexperimente an mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Analog zu dem in 5.4 zuvor durchgeführten Experiment wurden hier zwei Peptide simultan eingesetzt, wobei es sich dabei um das FITC-markierte formstabile β -hairpin Peptid **P34a**, sowie die unstrukturierte 14 Aminosäuren native Sequenz des eif5a **P1** handelte. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 5-23 gezeigt.

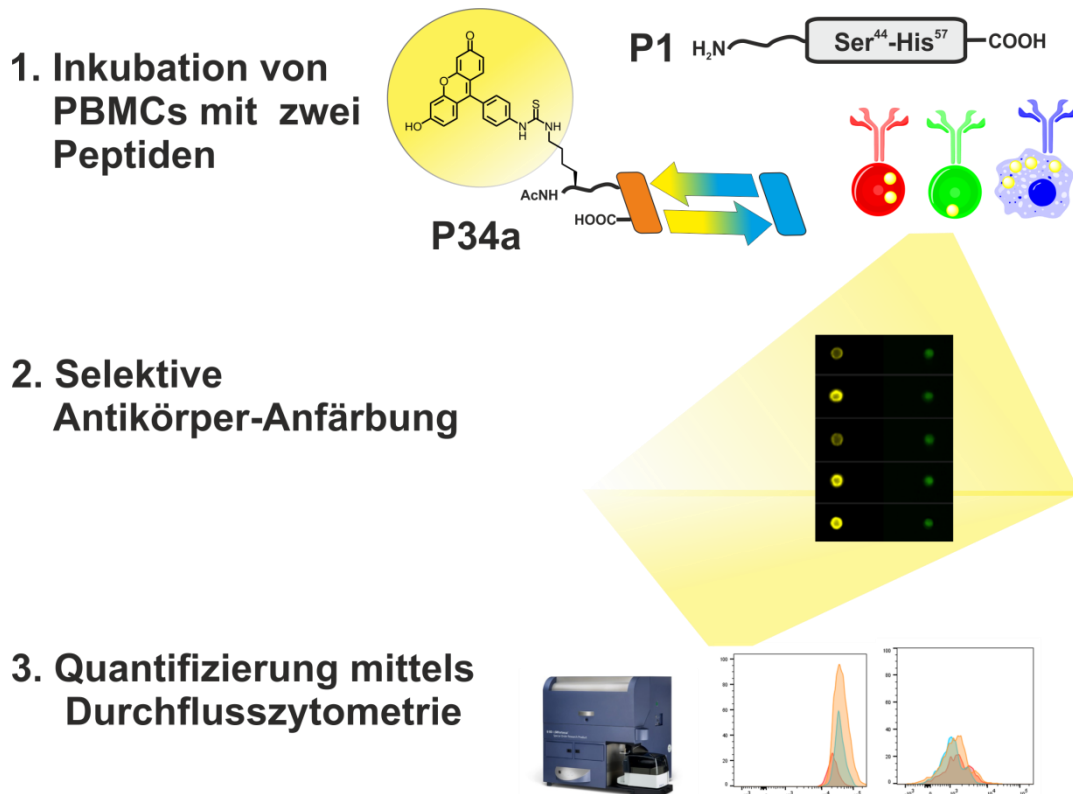


Abbildung 5-23: Durchführung der Konkurrenz-Experimente an PBMCs: Analog zu Abbildung 5-13 wurden frisch isolierte PBMCs simultan mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid **P34a** und dem nicht markierten Peptid **P1** behandelt und für eine bestimmte Zeit inkubiert. Durch die Konkurrenz beider Peptide kann ein veränderter Phänotyp erhalten werden, der dann über die Analyse mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden kann.

Wird davon ausgegangen, dass die detektierte, bevorzugte Aufnahme des Peptids **P34a** in Monozyten/Makrophagen durch die Sekundärstruktur induziert wird, so kann die Annahme getroffen werden, dass in diesem Experiment auch das native eif5a-Peptid **P1** den FITC-Phänotyp verändern sollte. Diese Hypothese beruht auf dem Modell der konformationellen Selektion. Demnach sollte der eif5a-selektive Rezeptor in der Lage sein, die entsprechend notwendige Konformation des *random-coil*-Peptids **P1** auszuwählen zu können. Gleichzeitig würde dies aber auch bedeuten, dass die Konformation des β -turns im Peptid **P1** in der Lage ist die aktive Konformation abzubilden (Abbildung 5-24).

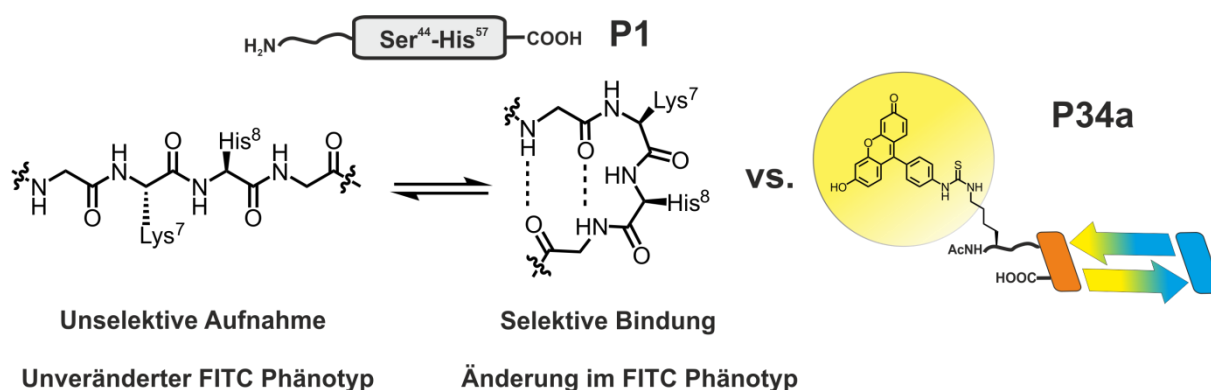


Abbildung 5-24: Durch konformationelle Selektion kann auch das *random-coil*-Peptid **P1** an den eIF5a-selektiven Rezeptor binden und damit ein biologisches Signal auslösen, welches den Phänotypen des FITC-gelabelten β -hairpin Peptids **P34a** verändert oder reduziert.

Weiterhin wurde ein Konkurrenzexperiment zwischen dem fluoreszenzmarkierten Peptid **P34a** und dem nicht markierten Strukturanalogen **P2** durchgeführt, um einen Effekt des Labels ausschließen zu können. Zusätzlich sollte die Intensität der FITC-Signals reduziert werden, da beide Peptide über die identische β -turn Struktur verfügen und damit ein ähnliches Bindungsverhalten zum Rezeptor haben sollten. Die Zytogramme der Experimente sind in Abbildung 5-25 gezeigt.

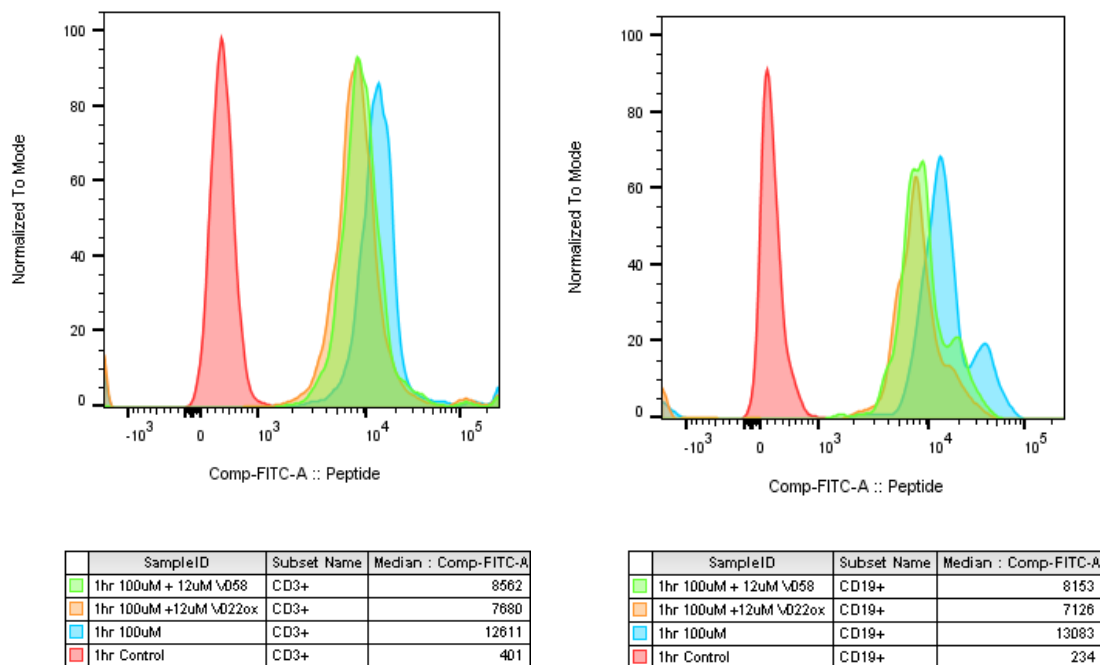


Abbildung 5-25: Konkurrenzexperiment in T-cells (links, CD3+) und B-Zellen (rechts, CD19+): 100 μ M des fluoreszenzmarkierten Peptids **34a** wurden zusammen mit je 12 μ M des nicht markierten Strukturanalogons **P2** (V022ox) und dem nativen eIF5a-Peptid **P1** (V058). In beiden Fällen ist eine Reduktion der FITC-Intensität sichtbar.

Die Quantifizierung der Daten aus Abbildung 5-25 ist in Abbildung 5-26 gezeigt.

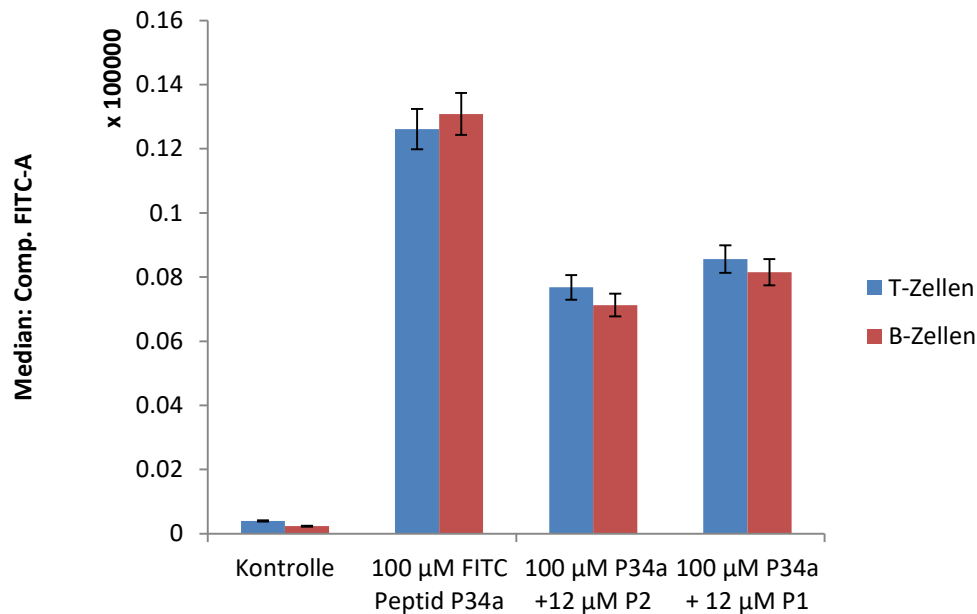


Abbildung 5-26: Konkurrenzexperiment zwischen dem fluoreszenzmarkierten Peptid **P34a** und dem nicht markierten Analogon **P2** bzw. dem nativen eif5a-Peptid **P1**: Es ist eine Reduktion der FITC-Intensität erkennbar, die für beide Konkurrenzexperimente etwa identisch ist.

Es wird deutlich, dass in beiden Experimenten bei Anwesenheit des jeweils zweiten Peptids die FITC-Intensität reduziert wird. Dies ist besonders für das nicht markierte β -hairpin Peptid **P2** leicht nachzuvollziehen, da es sich hierbei laut NMR-Spektroskopie um identische β -turn Strukturen handelt. Unter der Annahme, dass sich die Konformation des turns während des Experiments nicht ändert und die Aufnahme durch die Sekundärstruktur gesteuert wird, sollten beiden Peptide ein ähnliches Bindungsverhalten zum Rezeptor aufweisen. Wird für das native eif5a-Peptid **P1** das Modell der konformationellen Selektion angenommen, so kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Reduktion der FITC-Intensität daher kommt, dass nicht die *random-coil*-Struktur an den Rezeptor bindet, sondern eine auf NMR-Skala nicht sichtbare Konformation, die der starren Konformation der zyklischen Peptide **P2** strukturell sehr nahe kommt.

Auch das Experiment bezüglich der spontan-apoptotischen T-Zellen gemäß Abbildung 5-21 wurde als Konkurrenzexperiment mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid **P34a** und dem nicht markierten Analogon **P2** wiederholt. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 5-27 gezeigt.

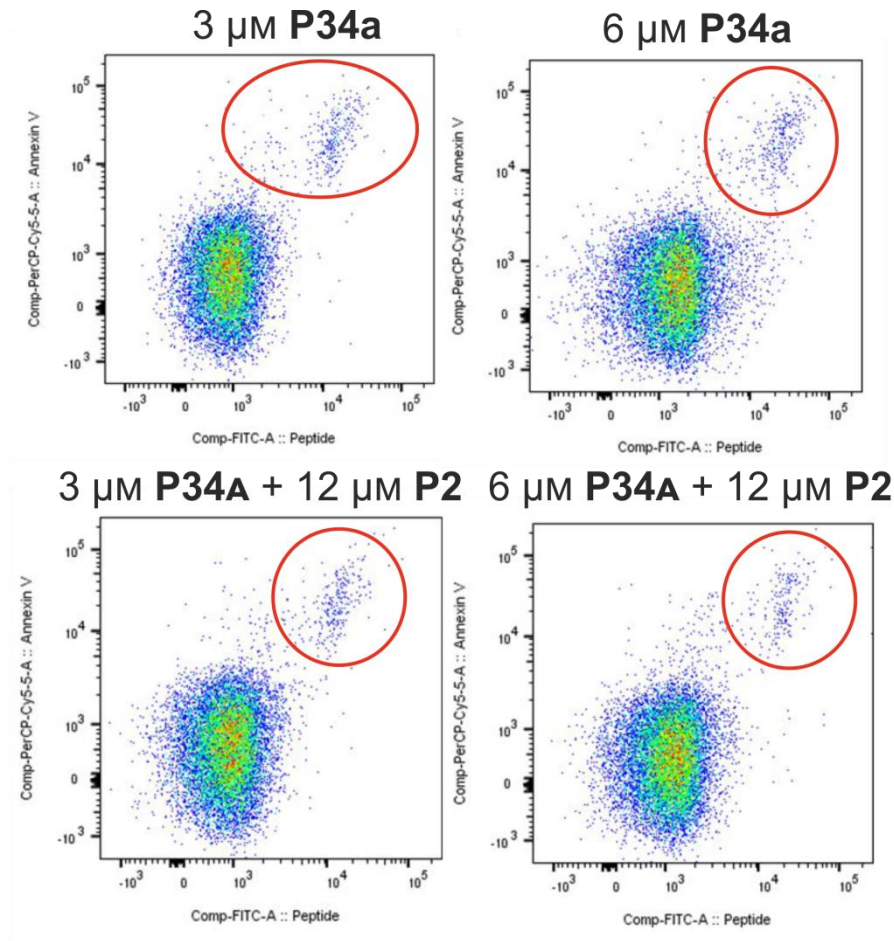


Abbildung 5-27: Konkurrenzexperiment bezüglich der Bindung der Peptide **P34a** und **P2** an spontan apoptotische T-Zellen (rot): Die erste Konzentrationsangabe bezieht sich auf das fluoreszenzmarkierte Peptid **P34**, die Zweite auf das nicht markierte Strukturanalogon **P2**: Bei Anwesenheit von **P2** ist die Bindung des FITC-gelabelten Peptids **P34** an die spontan apoptotischen T-Zellen reduziert.

Es kann auch hier gezeigt werden, dass das Bindungsverhalten der beiden Peptide an die spontan apoptotischen T-Zellen sehr ähnlich ist. Durch Zugabe des nicht markierten, aber strukturell zu **P34a** analogen Peptids **P2**, wird die gebundene Population, welche das FITC-Peptid bindet, verringert.^[244]

5.6 Medizinische Relevanz des Bindungsverhaltens der Peptide

Phagozytische Zellen umfassen mehrere Funktionen, die für die Beseitigung von Zelldebris von essentieller Bedeutung sind, indem sie systematischen Input generieren, welcher entweder als immunogen (spezifische Immunantwort) oder tolerogen (keine Immunantwort) erkannt wird. Funktionale Defekte dieser Phagozyten können sowohl endo- als auch exogene Ursachen haben.^[246] Als endogene Ursachen können genetische Mutationen, solche wie beispielsweise Malignitäten^[247,248] oder die Prionen-Krankheit^[249–251] genannt werden. Exogene Ursachen sind solche Pathogene, die einer Immunantwort entfliehen, indem diese Resistenzen gegenüber den Phagozyten entwickeln. Infektiöse Pathogene, die durch Einlagern in Makrophagen der Immunantwort entkommen, umfassen einige schwer zu behandelbare Krankheiten, wobei besonders das *mycobacterium tuberculosis* (TB) zu erwähnen ist. Im Jahre 2013 entwickelten ca. neun Millionen Menschen weltweit das Krankheitsbild der Tuberkulose, wobei 1.5 Millionen der Krankheit erlagen (1.2 Millionen in 2012, Abbildung 5-28).^[252,253] Grund hierfür ist unter anderem die zunehmende Multiresistenz des Bakteriums gegenüber den klinisch angewandten Therapeutika. Im Jahre 2013 meldeten 84 Länder weltweit verschiedenste Fälle von multiresistenter Tuberkulose (MDR-TB).^[252] Diese Multiresistenzen reduzieren dabei die Hoffnung auf eine Eliminierung dieser Krankheitsbilder durch immunologische oder pharmakologische Behandlung. Das hier beschriebene Bindungsverhalten des *hairpin* Peptids **P2** bezüglich der Makrophagen könnte also als Transport-System („Carrier“) genutzt werden, um klinisch relevante TB-Wirkstoffe, wie Levofloxacin durch die Konjugation mit dem Peptid zur Makrophage zu transportieren. Nachfolgend wird daher diese Konjugation untersucht und diskutiert. Weitere Krankheitsbilder, bei welchen der Host durch Nisten in den Makrophagen der Immunantwort entflieht, sind für Bakterienstämme beispielsweise Milzbrand^[254], typhoidale und nicht-typhoidale Salmonellen^[255] und sämtliche Chlamydien-Spezies.^[256] Auch in Protozoen^[257], Fungi^[258] und viralen Erkrankungen ist dieser Verlauf bekannt.^[244,259]

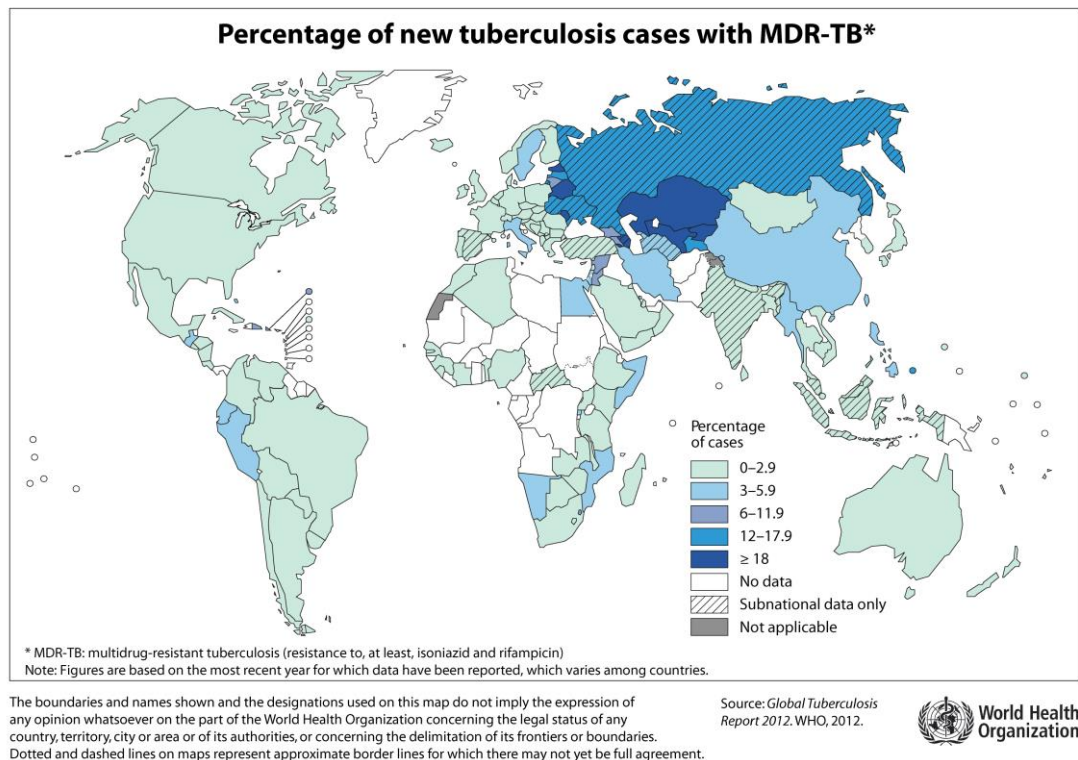


Abbildung 5-28: Schematische Darstellung neu-registrierter MDR-TB Fälle im Jahr 2012, herausgegeben von der *World Health Organization* (WHO).^[260]

5.7 Anbindung eines Tuberkulose Wirkstoffes an β -hairpin Peptide

Die starke Anbindung des FITC-markierten Peptids **P34a** an Monozyten in den zuvor diskutierten Durchflusszytometrie Experimenten legt den Ansatz nahe, dass die designten β -hairpin Peptide als *Carrier* für Tuberkulose-Wirkstoffe zu Nutzen sind. Abbildung 5-29 zeigt die chemischen Strukturen einiger, klinisch relevanter Tuberkulose-Wirkstoffe, wobei hier zwischen *first-* und *second line*-Wirkstoffen unterschieden wird.^[261] Bei *first line*-Wirkstoffen handelt es sich um jene Wirkstoffe, die die höchste Aktivität gegenüber dem *myobacterium tuberculosis* aufweisen. Diese werden in der Regel bei Patienten eingesetzt, welche erstmals mit TB-Wirkstoffen behandelt werden. Alle weiteren Wirkstoffe werden als *second line* bezeichnet, welche vor allem dann zum Einsatz kommen, wenn sich bereits Resistenzen gegenüber den *first-line* Drugs aufzeigen.

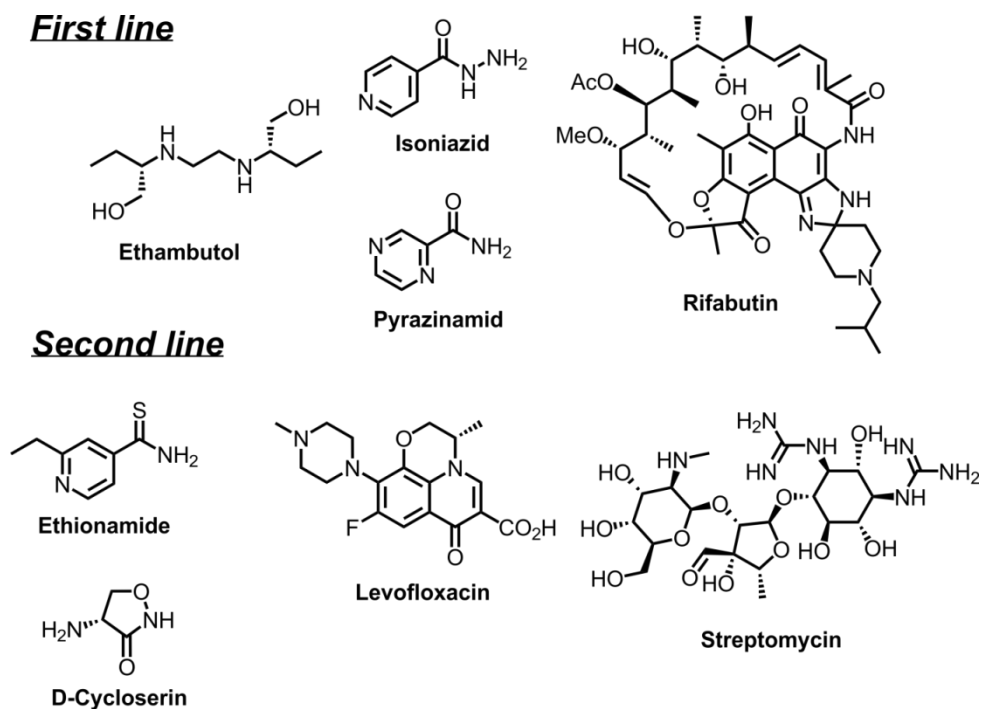


Abbildung 5-29: Strukturen der klinisch relevanten TB-Medikamente, unterteilt in *first-* und *second-line-* Wirkstoffe.^[252]

Zur Konjugation der Wirkstoffe an das *hairpin*-Peptid **P2**, mit welchem die zuvor diskutierten Durchflusszytometrie Experimente durchgeführt wurden, sind mehrere Ansätze denkbar, die nachfolgend diskutiert werden.

5.7.1 Kovalente Anbindung von Levofloxacin

Für die kovalente Anbindung wurde Levofloxacin als Wirkstoff gewählt, da die im Molekül bereits vorhandene Carbonsäure durch Ausbildung einer Amidbindung am *N*-Terminus des Peptids unter SPPS-Bedingungen erfolgen kann.^[262] Levofloxacin gehört zur Gruppe der Fluoro-Chinolone und wird als Breitband-Antibiotikum eingesetzt. Dabei zeigt es Aktivität gegenüber Gram-positiver als auch Gram-negativer Bakterien, die sich signifikant vom racemischen Vorläufer, dem Ofloxacin, unterscheidet. Als Wirkmechanismus wird die Inhibition von Typ II Topoisomerasen, welche für das DNA-Supercoiling verantwortlich sind, angenommen. Clamydrien und Pneumokokken zeigen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber dem Wirkstoff.^[263] Häufige Nebenwirkungen von Lexofloxacin-Therapien sind Übelkeit, Durchfall und erhöhte Leberenzymwerte. Auch über die erhöhte Expression von Matrix-Metallproteasen wurde berichtet, was in einer reduzierten Festigkeit von Sehnen und Bändern resultiert.^[264,265] Analog zur FITC-Markierung in Schema 5-1 wurde dazu die 14 AS Sequenz von **P2** mit drei Lys-Einheiten am *N*-Terminus erweitert, um eine Wechselwirkung des

Levofloxacin mit dem Peptidrückgrat zu vermeiden. An das *N*-terminale Lys^a in **57** wurde das Levofloxacin unter Standardbedingungen erfolgreich gekuppelt. Nach Disulfid-Oxidation und Aufreinigung kann die erfolgreiche Konjugation in **P35** massenspektrometrisch, als auch NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden (Abbildung 5-30).^[266]

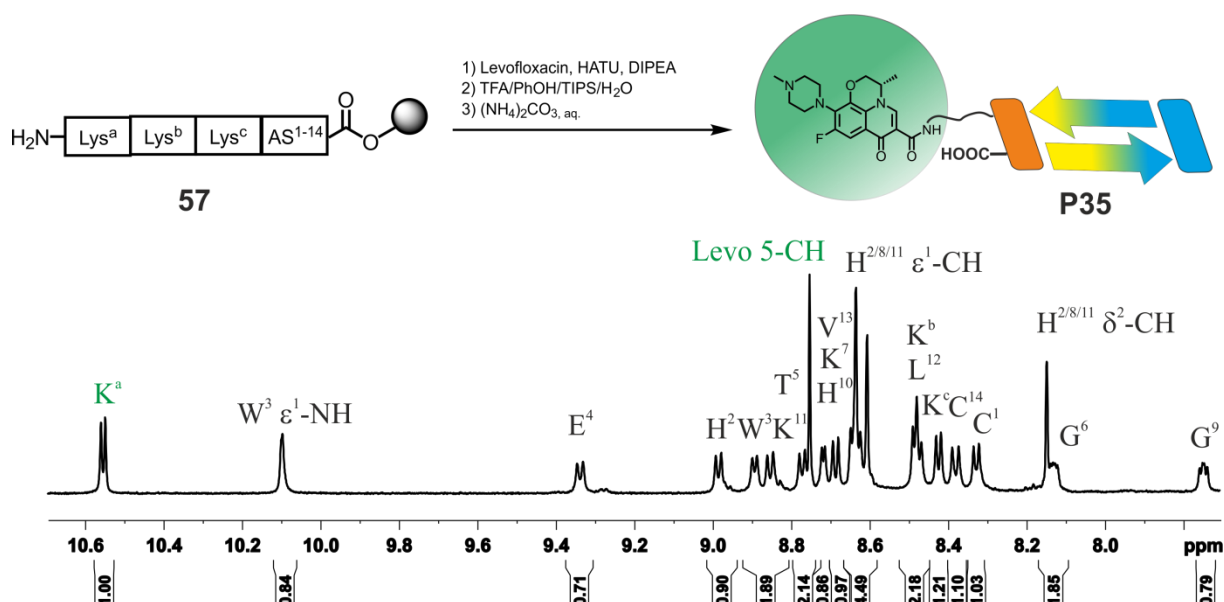
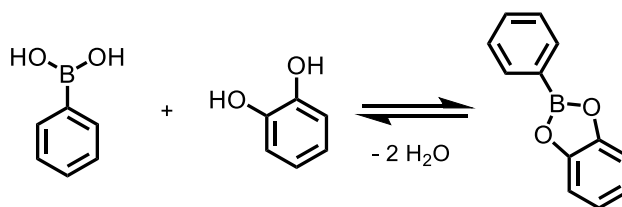


Abbildung 5-30: Synthese der Levofloxacin-funktionalisierten Peptids **P35**: Nach Anbringung eines Lys-Tags in **57**, wurde Levofloxacin an den *N*-Terminus des Peptids gekuppelt. NMR-spektroskopische Analyse kann bewiesen werden, dass der Wirkstoff quantitativ an das Peptid **P35** gebunden ist. (Peptid zeigt charakteristisches Signal im ¹⁹F-NMR-Spektrum).

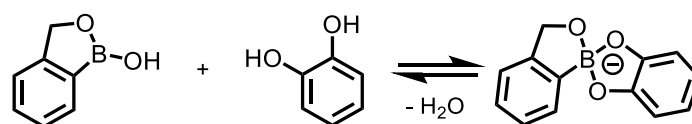
5.7.2 Reversible Anbindung von Levofloxacin und Cycloserin

Eine weitere Möglichkeit zur Konjugation des Wirkstoffes mit dem Peptid ist die reversible Veresterung über Boronsäure/Boroxol-Einheiten mit einem vicinalen Diol (Schema 5-2).^[97]



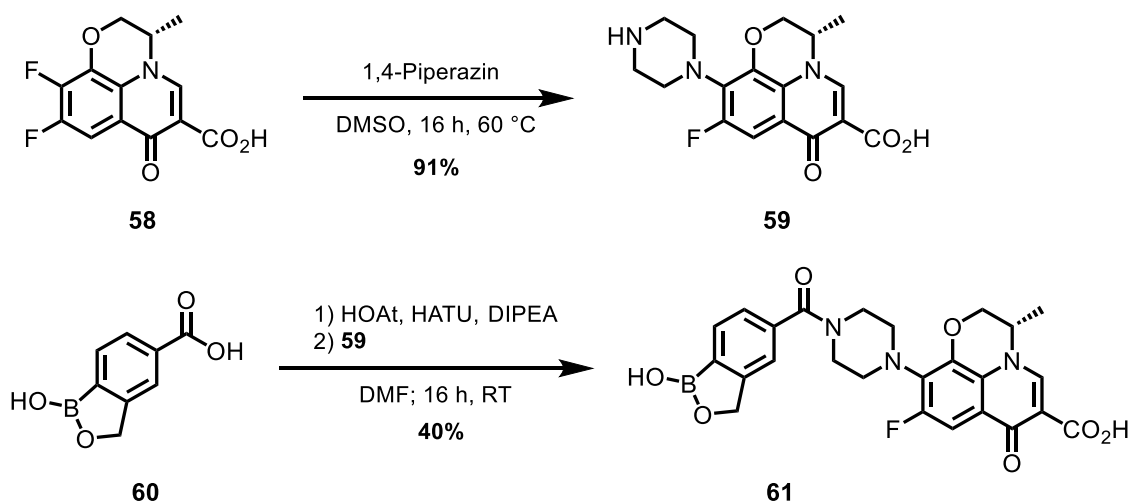
Schema 5-2: Boronsäureveresterung am Beispiel der Reaktion zwischen Phenylboronsäure und Catechol.

Bei der Veresterung einer Boronsäure mit einem vicinalen Diol ist die Wahl des Lösungsmittels von entscheidender Bedeutung. Wie in Schema 5-2 gezeigt, handelt es sich bei der Vesterungsreaktion um eine Gleichgewichtsreaktion, bei der im Zuge der Reaktion zwei Äquivalente Wasser freigesetzt werden, sodass diese Reaktion nicht im wässrigen Milieu durchgeführt werden kann. Die Reaktion muss also in einem organischen Lösungsmittel, wie beispielsweise DMSO oder Chloroform stattfinden. Eine weitere Möglichkeit der reversiblen Veresterung neben den Boronsäure ist die Anwendung von Benzoboroxolen. Dieses Strukturmotiv enthält neben einem Phenylring einen annelierten Oxaborol-Ring.^[197,267–269] Ein entscheidender Unterschied der Benzoboroxole zur verwandten Boronsäure ist der deutlich niedrigere pK_s-Wert von 7.34 im Vergleich zu 8.80 für die Phenylboronsäure.^[269,270] Bei Umsetzung mit einem vicinalen Diol bildet sich eine Boronat-Struktur aus (Schema 5-3). Aufgrund der starken Diol-Bindung dieses Strukturmotivs können Benzoboroxole in der Fruktose-Sensorik eingesetzt werden.^[271]



Schema 5-3: Boronsäureveresterung am Beispiel der Reaktion zwischen Benzoboroxol und Catechol.

Zur reversiblen Veresterung der Wirkstoffe Levofloxacin und D-Cycloserin sind zwei retrosynthetische Ansätze denkbar. Hier werden entweder das Peptid mit einem vicinalen Diol und der Wirkstoff als Boronsäure/Boroxol funktioniert oder umgekehrt. Es wurde der Ansatz der Diol-Funktionalisierung des Peptids und der Boronsäure/Boroxol-Funktionalisierung des Wirkstoffs gewählt, da in der Arbeitsgruppe Geyer das Dipeptid-Mimetikum Hot=Tap bereits ausgiebig auf dessen Boronsäure-bindenden Eigenschaften in einer Peptid-Umgebung untersucht wurde.^[197,198] Das Peptid **P2** wurde dazu *N*-terminal mit Hot=Tap funktionalisiert, analog zur Levofloxacin-Anbindung in **P35**. Da Levofloxacin neben der Carbonsäure keine reaktive Position besitzt, die einfach adressiert und in wenigen Stufen in das entsprechende Benzoboroxol überführt werden kann, wurde zunächst Desmethyl-Levofloxacin **59** aus dem 9,10-Difluoro-Levofloxacin-Vorläufer **58** synthetisiert. Desmethyl-Levofloxacin **59** kann in einer nukleophilen, aromatischen Substitutionsreaktion mit 1,4-Piperazin in einer Stufe erhalten werden. Anschließende Voraktivierung der Benzoboroxol-Carbonsäure **60** mit anschließender Zugabe des Desmethyl-Levofloxacins **59** lieferte das Levofloxacin-Boroxol-Addukt **60** (Schema 5-4).



Schema 5-4: Synthese des Benzoboroxol-funktionalisiertem-Levofloxacin **61**: Ausgehend von **58** konnte Desmethyl-Levofloxacin **59** in einer nukleophilen aromatischen Substitution erhalten werden. Anschließende Umsetzung mit voraktivierten der Benzoboroxol-Carbonsäure **60** lieferte **61**.

Die Veresterungsreaktion zwischen dem Levofloxacin-Boroxol **61** und dem *N*-terminal Hot=Tap funktionalisiertem Peptid **P36** wurde unter physiologischen Bedingungen in NMR-Maßstab durchgeführt (Abbildung 5-31).

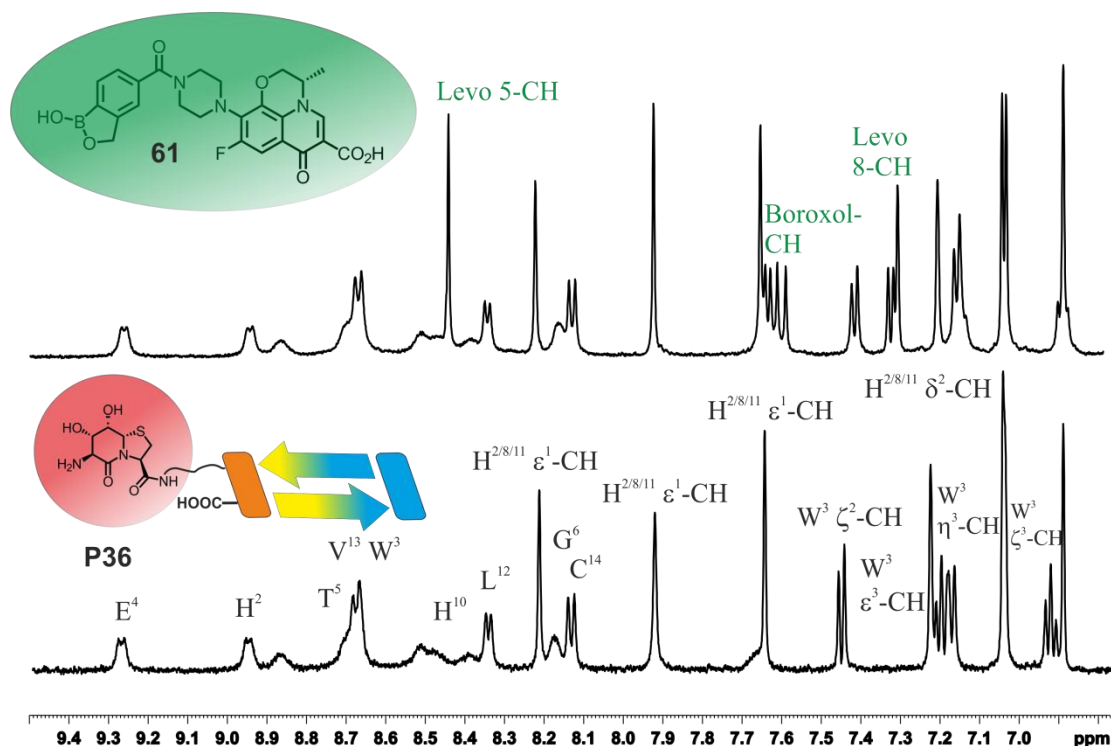


Abbildung 5-31: NMR-spektroskopische Analyse (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 7.0 der Boroxol-Veresterung von **61** mit dem Hot=Tap Peptid **P36**. Aus der Lage der Signale kann keine eindeutige Aussage über den Umsatz der Boronat-Bildung getroffen werden.

In einer zuvor durchgeführten pH-Wert-abhängigen Titration analog zu **P2** wurde zunächst bestätigt, dass sich auch die Sekundärstruktur des Peptids bei diesem pH-Wert ausbildet (Abbildung 4-37). Die NMR-spektroskopische Analyse der reversiblen Veresterung des Peptids **P36** mit dem Levofloxacin-Derivat **61** ist in Abbildung 5-31 gezeigt. Beide Verbindungen wurden in einem theoretisch äquimolaren Verhältnis bei pH 7 vorgelegt, wobei durch Integration charakteristischer Signale bestimmt werden kann, dass das Levofloxacin-Derivat **61** in leichtem Überschuss vorliegt. Ursache hierfür könnte der nicht-quantifizierbare TFA-Gehalt beider Verbindungen sein. Um nun aus Abbildung 5-31 eine Aussage über den Umsatz der Boronat-Bildung treffen zu können, müssen die relevanten Levofloxacin und Boroxol-Signale mit den Edukt-Spektren verglichen werden, was in Abbildung 5-32 gezeigt ist.^[266]

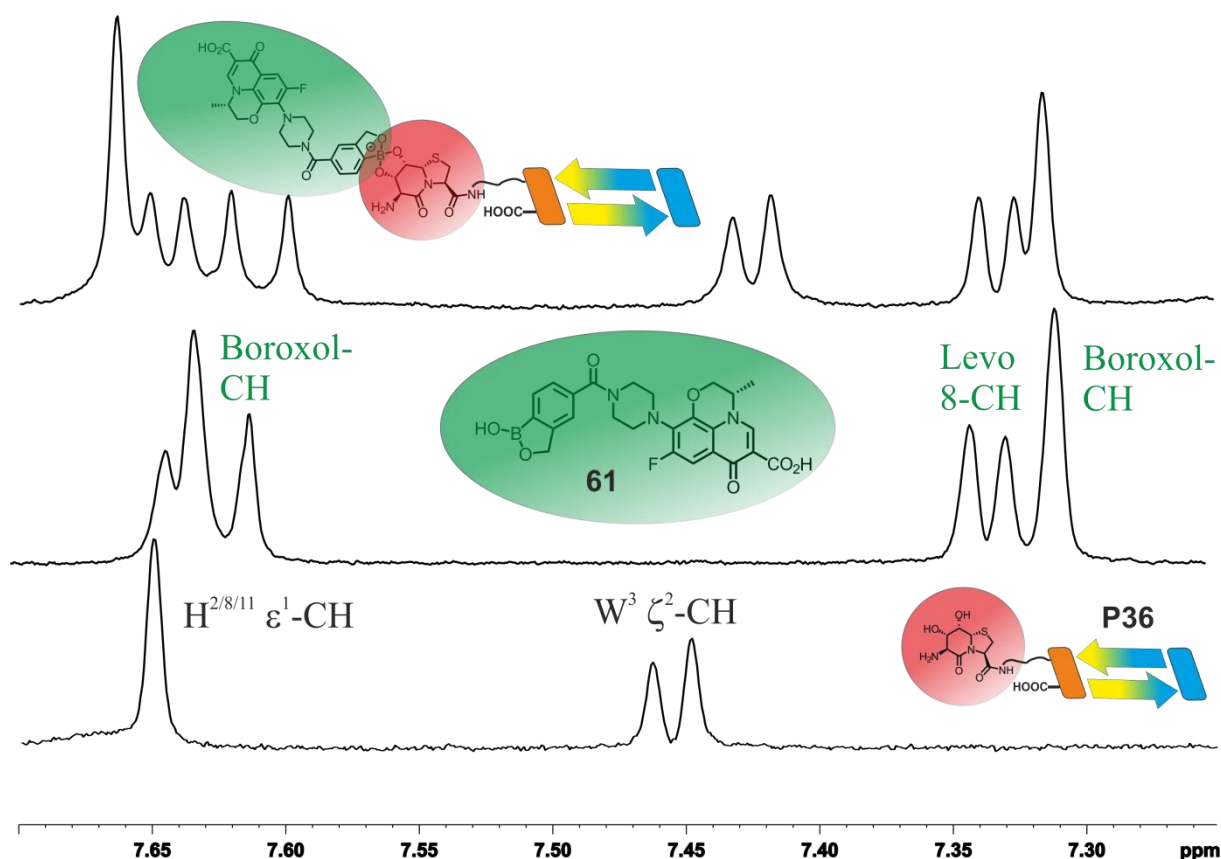
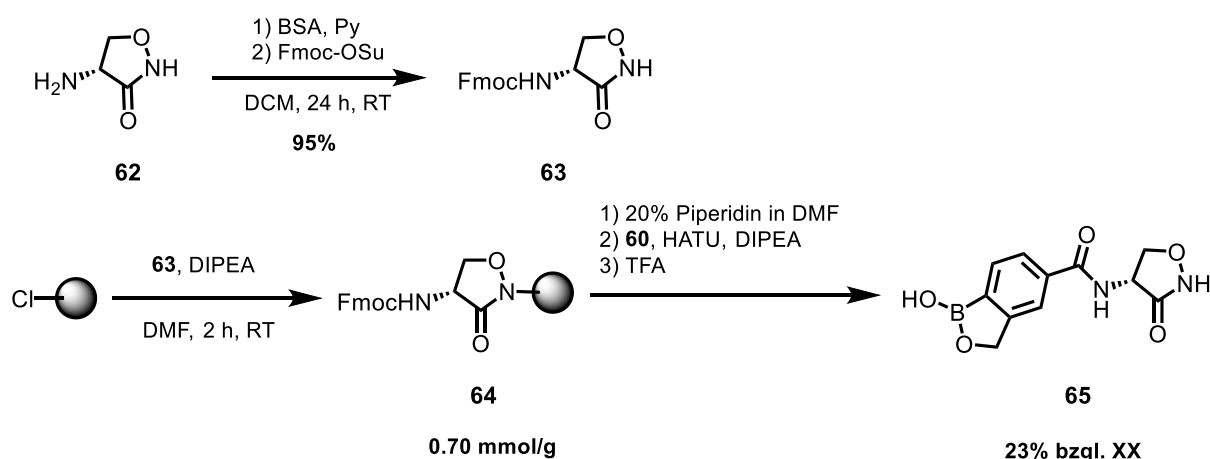


Abbildung 5-32: NMR-spektroskopische Analyse (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 7.0) der Boroxol-Veresterung von **61** mit dem Hot=Tap Peptid **P36**. Im Vergleich mit den Edukt-Spektren des Peptids **P36** (unten), sowie dem Boroxol **61** (mittig) zeigt sich, dass sich die Signal-Aufsplittings der relevanten Boroxol- und Levofloxacin-Protonen verändern, sobald das Peptid zugegeben wurde (oben).

Aus Abbildung 5-32 kann ein Umsatz nicht eindeutig bestimmt werden. Die Signallage, sowie deren Multiplizitäten ändern sich im Zuge der Umsetzung des Boroxols **61** mit dem Peptid **P36**. Auch für die benzylichen Protonen des Boroxols wird ein zweiter Signalsatz erhalten, da sich dieser jedoch sehr nahe an der eingestrahlten Messfrequenz der *Watergate*-Wasserunterdrückung befindet, kann dieser Umsatz nicht quantifiziert werden.

Auch bei der Funktionalisierung von D-Cycloserin **62** kann vom Benzoboroxol **60** ausgegangen werden. Hierzu wurde D-Cycloserin **62** zunächst am primären Amin Fmoc geschützt, bevor das Isooxazolidinon auf 2-CTC-Harz geladen wurde **64**. Anschließend wurde die Amin-Schutzgruppe entfernt und die Benzoboroxol-Carbonsäure **60** an das Amin gebunden. Abspaltung vom polymeren Träger liefert schließlich das Dipeptid **65**, welches analog zum vorhergehenden Experiment mit dem Peptid **P36** reversibel verestert werden kann (Schema 5-5).



Schema 5-5: Synthese des D-Cycloserin-Benzoboroxol Dipeptids **65**: Fmoc-Schützung von D-Cycloserin **62** lieferte **63**, welches anschließend am Isooxazolidinon-Stickstoff an den polymeren Träger gebunden wurde. Nach Abspaltung der *N*-terminalen Schutzgruppe mit 20% Piperidin in DMF wurde die Benzoboroxol-Carbonsäure **60** auf das freie Amin gekuppelt. Nach saurer Abspaltung vom Harz konnte das Dipeptid **65** erhalten werden, was weiterführend in NMR-Experimenten zur Veresterung mit dem Hot=Tap Peptid **P36** verwendet wurde.

Bei der äquimolaren Umsetzung des Boroxols **65** mit dem Hot=Tap Peptid **P36** konnte NMR-spektroskopisch kein Umsatz festgestellt werden (Abbildung 5-33).

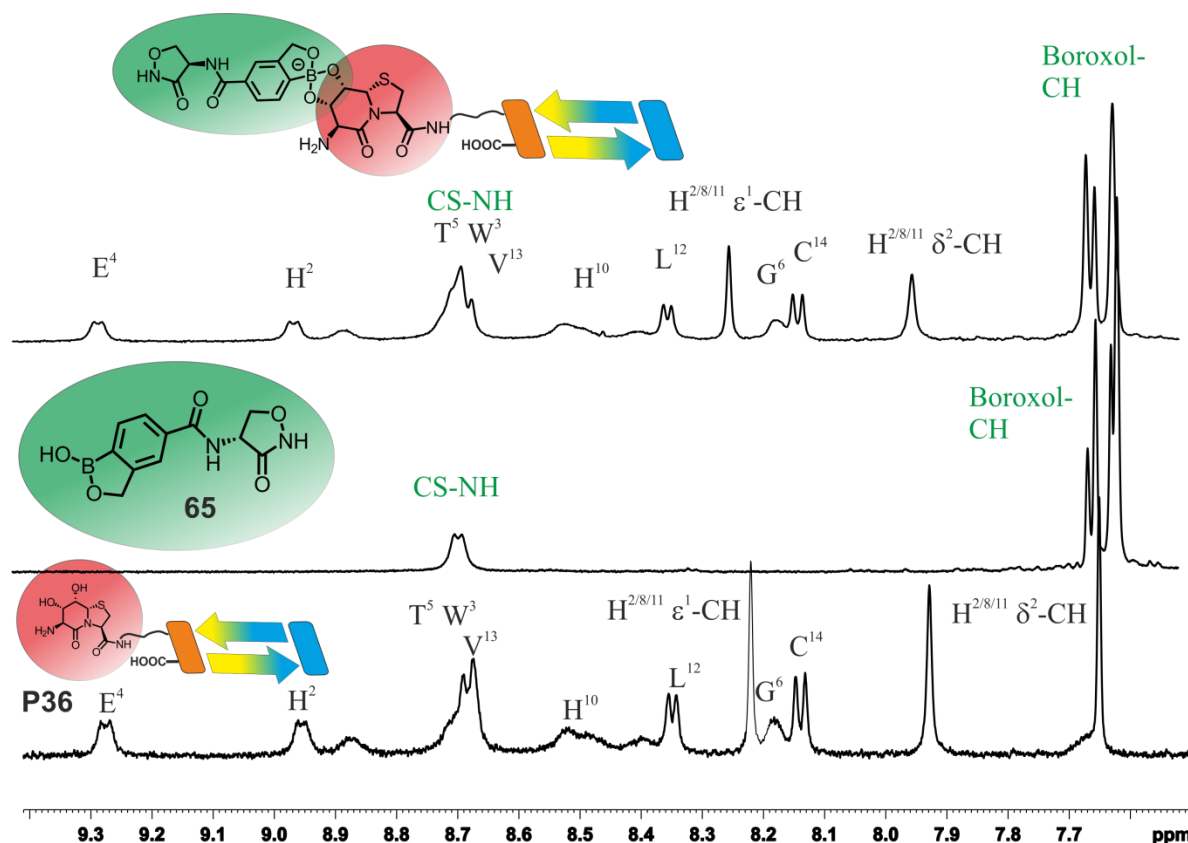


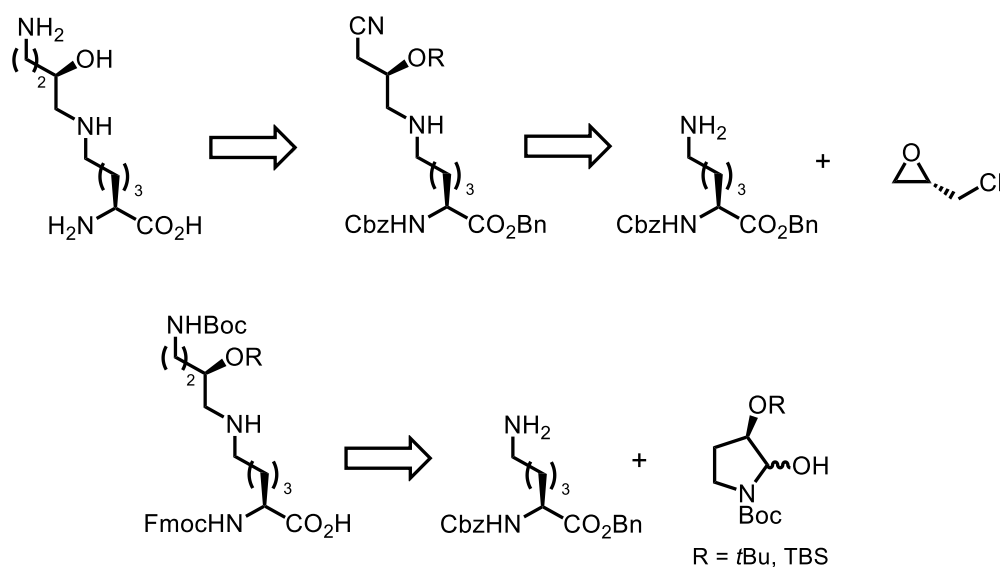
Abbildung 5-33: NMR-spektroskopische Analyse (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 7.0) der Boroxol-Veresterung von **65** mit dem Hot=Tap Peptid **P36**. Im Vergleich mit den Edukt-Spektren des Peptids **P36** (unten), sowie dem Boroxol **65** (mittig) zeigt sich, dass kein Umsatz stattgefunden hat.

Zusammenfassend lässt sich zu der hier gezeigten Strategie sagen, dass die reversible Chemie der Boronat-Bildung zur Konjugation von Tuberkulose-Wirkstoffe an das Peptid geeignet ist. Der Umsatz der Veresterung unter physiologischen Bedingungen ist dabei stark vom Substrat abhängig. Um diese Systeme in den PBMCs testen zu können, sollte weiterführend die Hydrolyse der Boronate auf NMR-Basis untersucht werden. Die Peptidkonjugate sollen zukünftig in Tuberkulose-Laborstudien an der *Rutgers University* angewendet werden. Aktuell liegen hierzu noch keine biologischen Ergebnisse vor.^[244]

6. Modifizierung der Lys⁷-Seitenkette

6.1 Synthese von Hypusin-haltigen Peptiden

Da ein beachtlicher Anteil des natürlich vorkommenden eIF5A in der hydroxylierten, also Hypusin-funktionalisierten Form vorliegt, könnten Hypusin-haltige β -hairpin Peptide als Inhibitoren der Hydroxylase dienen. Die flexible Seitenkette könnte zudem zum Mapping der *active-site* der Hydroxylase dienen. Aus diesem Grund wurde die Synthese eines SPPS-geeigneten L-Hypusin-Bausteins untersucht.^[16,58] Dabei sind mehrere Ansätze bereits literaturbekannt^[16,223,272–276], wobei jedoch ausschließlich der von *Deshayes et al.* im Jahre 2015 publizierte Ansatz zur Verbindung **87** führt, die mit entsprechenden Schutzgruppen direkt in der Peptidsynthese eingesetzt werden kann (Schema 6-1).^[277]

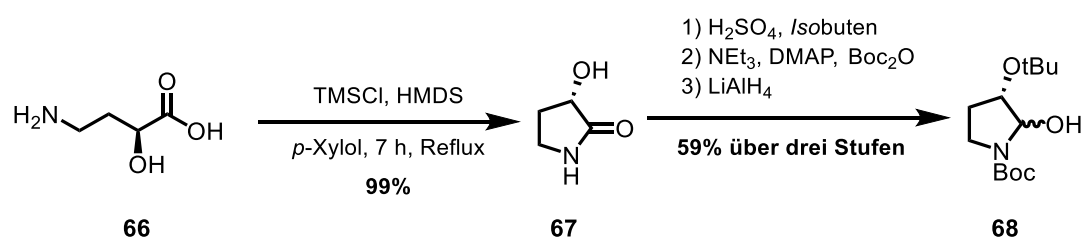


Schema 6-1: Retrosynthetische Ansätze zur Darstellung von Festphasenpeptidsynthese geeignetem Fmoc-L-Hpu(*t*Bu, Boc)-OH bzw. Fmoc-L-Hpu(TBS, Boc)-OH **87**. Beide Ansätze sind bereits in der Fachliteratur bekannt, wobei die Darstellung ausgehend von Cbz-L-Lys-OBn **71** und (*S*)-(+)-Epichlorhydrin mit anschließender Kettenverlängerung durch Cyanid-Substitution des Chlorids nicht ein entsprechend orthogonal, geschütztes, für SPPS-geeignetes Derivat.^[275,276] Die 2015 von *Deshayes et al.* publizierte Methode verwendet eine reduktive Aminierung des identischen L-Lysin-Derivats mit einem Halbaminol **68**, welches ausgehend von (*S*)-4-Amino-2-Hydroxybuttersäure **66** erhalten werden kann.^[277,278] Da bei dieser Methode die Stereochemie des Alkohols erhalten bleibt, muss die reduktive Aminierung mechanistisch durch den offenkettigen Aldehyden **II** erfolgen.^[277,279]

Der bereits 2001 publizierte Ansatz von *Bergeron et al.* liefert das komplett entschützte L-Hypusin-Derivat. Hierbei wird vom L-Lysin-Derivat ausgegangen, welches mit (*S*)-(+)-Epichlorhydrin umgesetzt wird. Das terminale Chlorid wird anschließend durch Cyanid

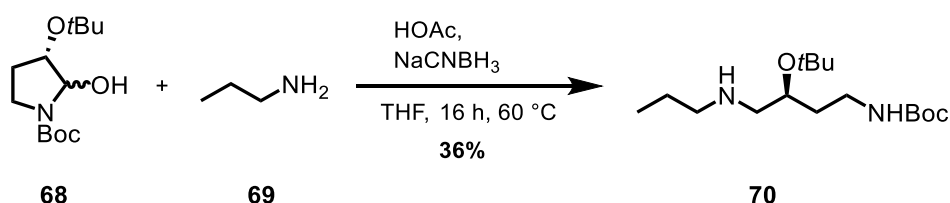
substituiert, um die gewünschte Länge der Seitenkette zu erhalten. Hydrogenolytische Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen mit gleichzeitiger Reduktion des Nitrils zum Amin liefert schließlich das L-Hypusin-Derivat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Route von *Deshayes et al.* näher untersucht.^[277] Schlüsselschritt dieser Route ist die reduktive Alkylierung der L-Lysin-Seitenkette von **71** mit dem Halbaminal **68** unter Erhalt der Stereochemie des sekundären Alkohols. Das Halbaminal kann in einer vierstufigen Synthese ausgehend von (*R*)-4-Amino-2-Hydroxybuttersäure **66** erhalten werden.^[277,280,281] Das entsprechende Derivat mit einer TBS-Schutzgruppe am sekundären Alkohol zersetzte sich bei der LAH-Reduktion. Da das entsprechende (*S*)-Isomer der 4-Amino-2-Hydroxybuttersäure **66** kommerziell wesentlich günstiger erhältlich ist, wurde zunächst mit diesem Substrat die Syntheseroute getestet. Die Synthese des Halbaminals ist in Schema 6-2 gezeigt.



Schema 6-2: Synthese von des Halbaminals **68** nach *Deshayes et al.*^[277]: Ausgehend von (*S*)-4-Amino-2-Hydroxybuttersäure **66** wurde zunächst durch Zylisierung das 2-Pyrrolidinon-Gerüst **67** erhalten. Nach der Schützung des sekundären Alkohols und des Amins wurde mittels LAH-Reduktion das Halbaminal **68** erhalten. Dieses wurde unmittelbar umgesetzt und erwies sich als nicht lagerbar.

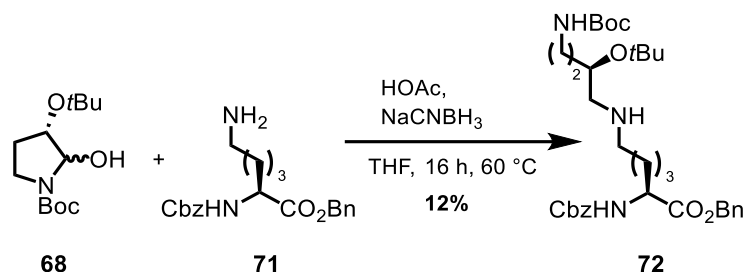
Ausgehend vom Halbaminal **68** wurde in einer Testreaktion mit *n*-Propylamin **69** der Schlüsselschritt der reduktiven Aminierung untersucht. Das gewünschte Produkt **70** konnte in 36% Ausbeute erhalten werden (Schema 6-3).



Schema 6-3: Testreaktion zwischen *n*-Propylamin **69** und dem Halbaminal **68**: Die reduktive Aminierung konnte erfolgreich durchgeführt werden.

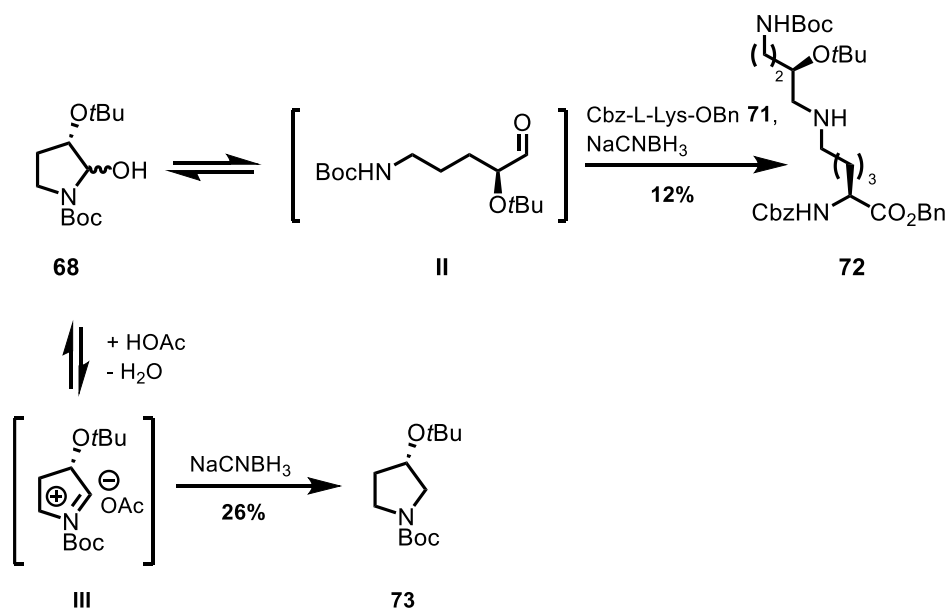
Da mittels dieser Testreaktion jedoch keine Aussage über den stereochemischen Verlauf der reduktiven Aminierung getroffen werden kann, wurde die Reaktion anschließend an Cbz-L-

Lys-OBn **71** durchgeführt. Sollte es im Zuge der reduktiven Alkylierung zur einer Epimerisierung des sekundären Alkohols kommen, so sollten, aufgrund der stereochemischen Integrität der α -Aminosäure, im ¹H-NMR-Spektrum des entsprechenden Produktes **72** zwei Diastereomere zu identifizieren sein (Schema 6-4).



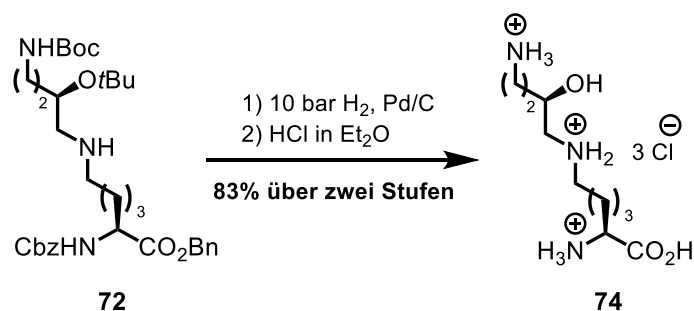
Schema 6-4: Darstellung von Cbz-L-Hpu(tBu, Boc)-OBn **72** ausgehend von einer reduktiven Alkylierung von Cbz-L-Lys-OBn **71** mit dem Halbaminal **68**. Da die stereochemische Integrität des sekundären Alkohols laut ¹H-NMR-Spektroskopie erhalten bleibt, kann mechanistisch von einer reduktiven Alkylierung des entsprechend offenkettigen Aldehyden ausgegangen werden.

Die stereochemische Integrität des sekundären Alkohols in **68** blieb im Zuge der reduktiven Alkylierung erhalten, was mittels ¹H-NMR Spektroskopie bewiesen werden konnte. Von den Autoren dieser Synthese wurde zusätzlich *Size Exclusion Chromatography* genutzt, um die Stereochemie von Cbz-L-Hpu(tBu, Boc)-OBn **72** zu bestätigen.^[277] Basierend auf diesen Befunden kann davon ausgegangen werden, dass die reduktive Alkylierung in dieser Reaktion vom azyklischen Aldehyden **II** und nicht dem entsprechenden zyklischen *N*-Acyliminiumion **III** ausgeht. Eine mechanistische Betrachtung ist in Schema 6-5 gezeigt. Zusätzlich zum L-Hypusin-Derivat **72** konnte als Nebenprodukt das reduzierte Pyrrolidin-Derivat **73** isoliert werden, was durch Reduktion des *N*-Acyliminiumions mechanistisch erklärt werden kann.^[277,279]



Schema 6-5: Möglicher Mechanismus der reduktiven Aminierung zum L-Desoxyhypusin-Derivat **72**: Das Halbaminal **68** liegt im chemischen Gleichgewicht mit dem entsprechenden α -chiralen Aldehyden **II**, welcher anschließend die Iminbildung und reduktive Alkylierung mit dem ϵ -Amin der Lysin-Seitenkette eingeht.^[277,279]

Aufgrund der geringen Ausbeute und der Bildung des Nebenproduktes **73** wurde diese Syntheseroute nicht weiter untersucht. Aus dem geschützten L-Hypusin-Derivat **72** wurde in einer zweistufigen Synthese das komplett entschützte L-Hypusin **74** erhalten, was im Jurkat-2D10 HIV-System getestet wurde. Die Synthese ist in Schema 6-6 gezeigt.



Schema 6-7: Darstellung des komplett entschützten L-Hypusins **74** mittels hydrogenolytischer Spaltung der Benzyl-Schutzgruppen und anschließender Abspaltung der Boc-Schutzgruppen durch HCl in Et₂O.

Im Jurkat 2D10 HIV-System konnte kein Einfluss der Virusexpression des Hypusins festgestellt werden. Es konnte keine Zytotoxizität beobachtet werden. Die Auftragungen von P1-Viabilität und GFP Expression sind in Abbildung 6-1 gezeigt.

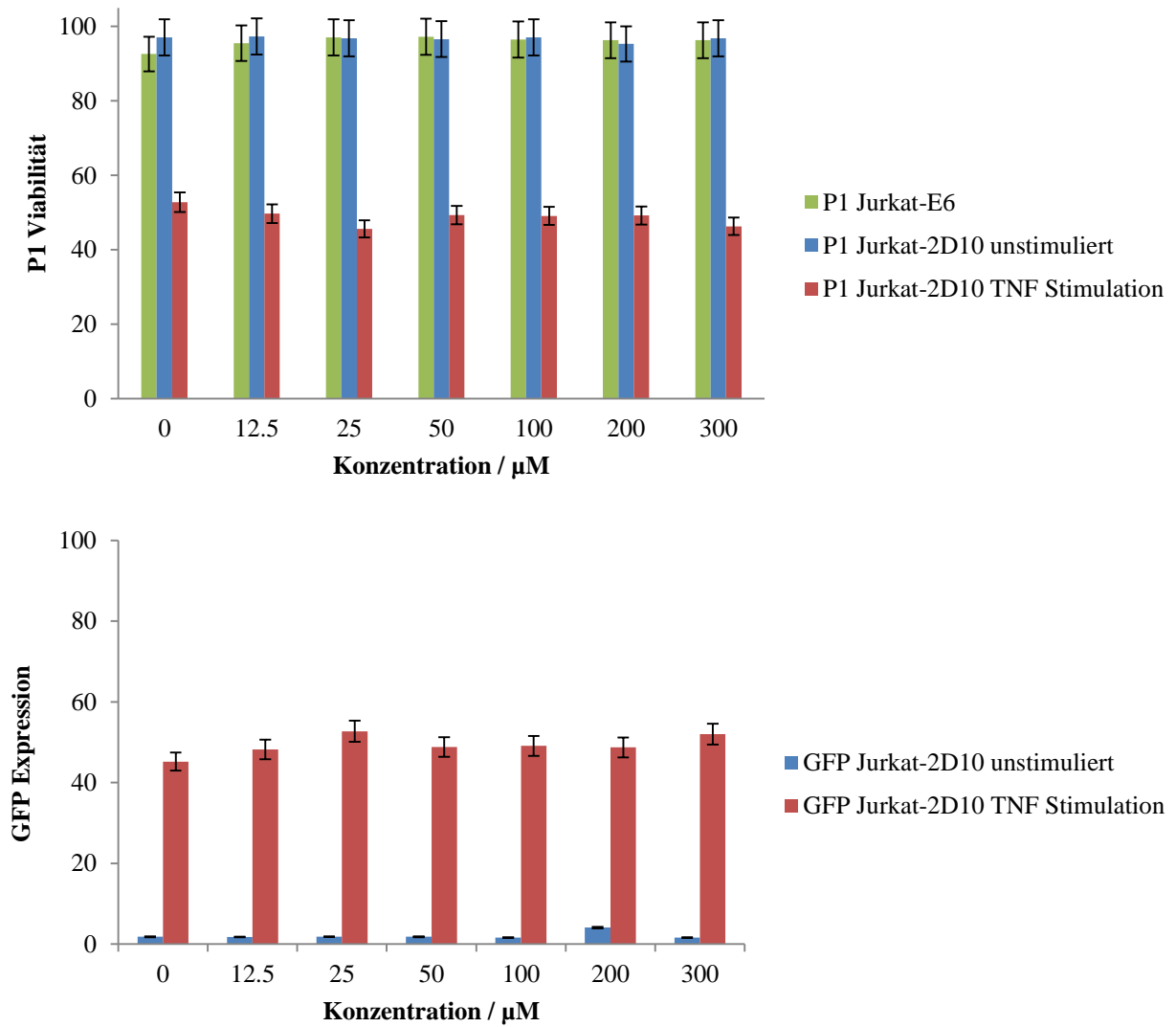
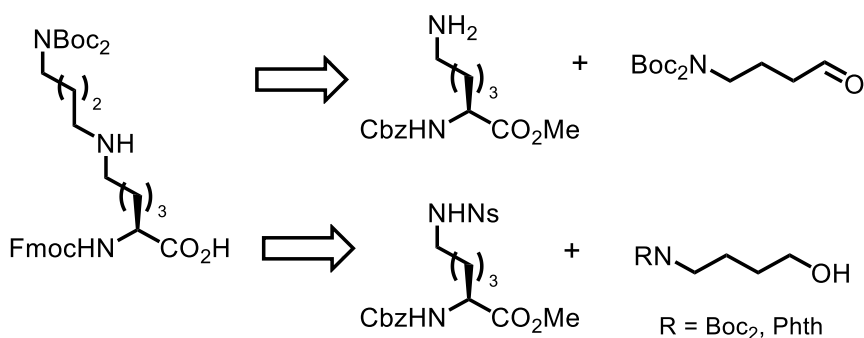


Abbildung 6-1: Untersuchung des Effekts von H-L-Dhu-OH·3HCl **74** im Jurkat 2D10 HIV-System. Es wird deutlich, dass die Behandlung der Zellen mit Verbindung **74** keinen Effekt auf die GFP-Expression in unstimulierten, sowie TNF- α -stimulierten 2D10-Zellen und damit auf die Virusexpression hat. Es konnte keine Zytotoxizität im DotBlot festgestellt werden. Die prozentualen Anteile sind aus der SSC vs. FSC Auftragung ausgelesen und unterscheiden sich nur unwesentlich von den Messwerten aus den B530A-Histogrammen.

6.2 Synthese von Desoxyhypusin-haltigen Peptiden

Die nahezu quantitative Umsetzung von aminobutyliertem eif5A zur hydroxylierten Form durch DOHH impliziert den Ansatz, dass aminobutylierte bzw. Desoxyhypusin-haltige β -hairpin Peptide als Inhibitoren der Hydroxylase dienen können. Aus diesem Grund wurde eine Synthese zum orthogonal geschützten Fmoc-L-Desoxyhypusin (Fmoc-L-Dhu(Boc, Boc₂)-OH **87** entwickelt. Zwei Ansätze sind dabei möglich, wobei der Ansatz der reduktiven Aminierung bereits in der Fachliteratur bekannt ist.^[282] In dieser Publikation wurde allerdings die Synthese nur bis zur komplett entschützten Aminosäure durchgeführt.^[21] Eine orthogonale Schutzgruppen-Strategie, die den Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese erst möglich macht, wurde von den Autoren nicht untersucht (Schema 6-8).

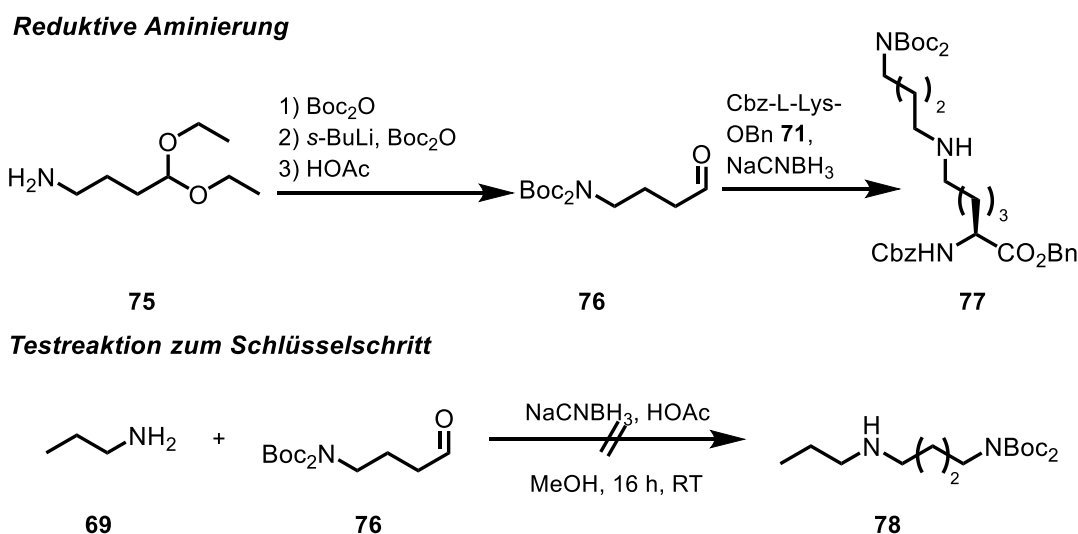


Schema 6-8: Retrosynthetische Ansätze zur Darstellung von Festphasenpeptidsynthese geeignetem Fmoc-L-Dhu(Boc, Boc₂)-OH bzw. Fmoc-L-Dhu(Boc, Phthal)-OH. Dabei sind zwei Ansätze denkbar: Eine reduktive Aminierung mit zweifach Boc-geschütztem 4-Aminobutyraldehyd **76** am ϵ -Amin eines orthogonal geschützten L-Lysin-Derivats oder eine *Mitsunobu*-Reaktion zwischen einem am ϵ -Amin nosylierten, orthogonal geschützten L-Lysin-Derivats **81** und einem geschützten 4-Amino-1-Butanol-Derivat **80**. Abschließende hydrogenolytische Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen und darauffolgende Fmoc-Schätzung des *N*-Terminus soll schließlich die SPPS-geeignete Aminosäure **87** liefern.

Die reduktive Aminierung geht von *N*- und *C*-terminal Benzyl-geschütztem L-Lysin **72** aus, welches mit zweifach Boc-geschütztem 4-Amino-1-butyraldehyd **76** umgesetzt wird. Das entstehende sekundäre Amin muss dann in der Folgereaktion ebenfalls Boc geschützt werden, bevor die hydrogenolytische Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen und eine anschließende Fmoc-Schätzung die Synthese komplettiert. Die zweite Syntheseroute beginnt mit identischer Schutzgruppen-Strategie für *N*- und *C*-Terminus, zusätzlich wird das ϵ -Amin durch Nosylierung in **81** für eine *Mitsunobu*-Reaktion aktiviert. Diese soll mit einem zweifach geschützten 4-Amino-1-Butanol Derivat **80** durchgeführt werden. Anschließende hydrogenolytische Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen mit darauffolgender Fmoc-

Schätzung soll schließlich den gewünschten Baustein für die Festphasenpeptidsynthese **87** liefern.

Beide Syntheserouten werden nachfolgend mit ihrem jeweiligen Schlüsselschritt der Verlängerung der Seitenkette untersucht. Dabei wurde der Schlüsselschritt in entsprechenden Testreaktionen auf kommerziell erhältliche Substrate vereinfacht, um direkt eine Aussage über den Erfolg dieser Route erhalten zu können, ohne vorher die aufwändigen Edukte mehrstufig darstellen zu müssen.



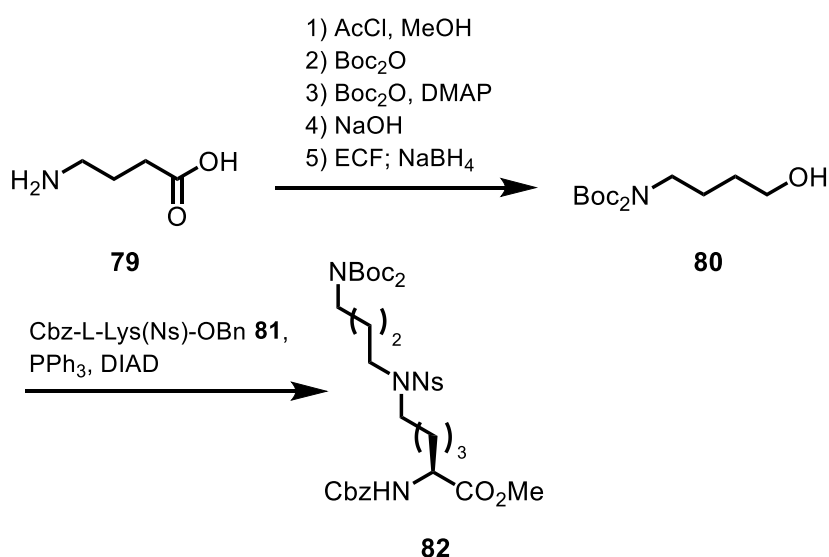
Schema 6-9: Schlüsselschritt und Testreaktion zur Syntheseroute der reduktiven Aminierung. Der entsprechende, zweifach Boc-geschützte 4-Aminobutylaldehyd **76** kann in einer dreistufigen Synthese ausgehend von 4-Amino-1-butylaldehyd-Diethylacetal **75** in einer literaturbekannten Route erhalten werden. Da die Testreaktion zwischen dem Aldehyden **76** und *n*-Propylamin **69** nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Ausgehend von kommerziell erhältlichem 4-Amino-1-butylaldehyd-Diethylacetal **75** wurde das primäre Amin zunächst Boc geschützt, bevor mit *s*-Butyllithium und Boc-Anhydrid das entsprechende Imid gebildet wurde. Mittels wässriger Essigsäure wurde das Acetal säurekatalytisch gespalten und der Aldehyd **76** wird erhalten.^[283–285] In einer Testreaktion mit *n*-Propylamin **69** konnten keine geeigneten Bedingungen (Variation von Lösungsmittel, Temperatur, pH-Wert und Reduktionsmittel) für ausreichenden Umsatz erhalten werden, weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde. Als Nebenreaktion konnte die Oxidation des Aldehyds **76** beobachtet werden (Schema 6-9).

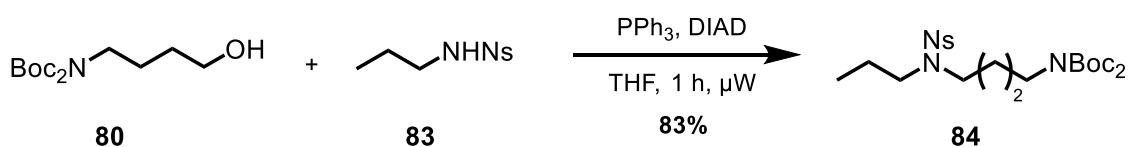
Der zweite Ansatz umfasst eine *Mitsunobu*-Alkylierung am nosylierten ϵ -Amin eines Benzylgeschützten L-Lysin Derivats **71** als Schlüsselschritt. Die Alkylierung sollte dabei mit einem zweifach Boc-geschütztem 4-Amino-1-butanol-Derivats **80** erfolgen, welches in einer fünfstufigen Synthese ausgehend von γ -Aminobuttersäure **79** erhalten werden kann (Schema 6-10).^[284–286]

Eine Testreaktion zwischen nosyliertem *n*-Propylamin **82** und dem entsprechenden 4-Amino-1-butanol Derivat **80** konnte erfolgreich durchgeführt werden, wobei die Ausbeute durch den Einsatz von Mikrowellen-Bedingungen effektiv gesteigert werden konnte.

Mitsunobu-Reaktion

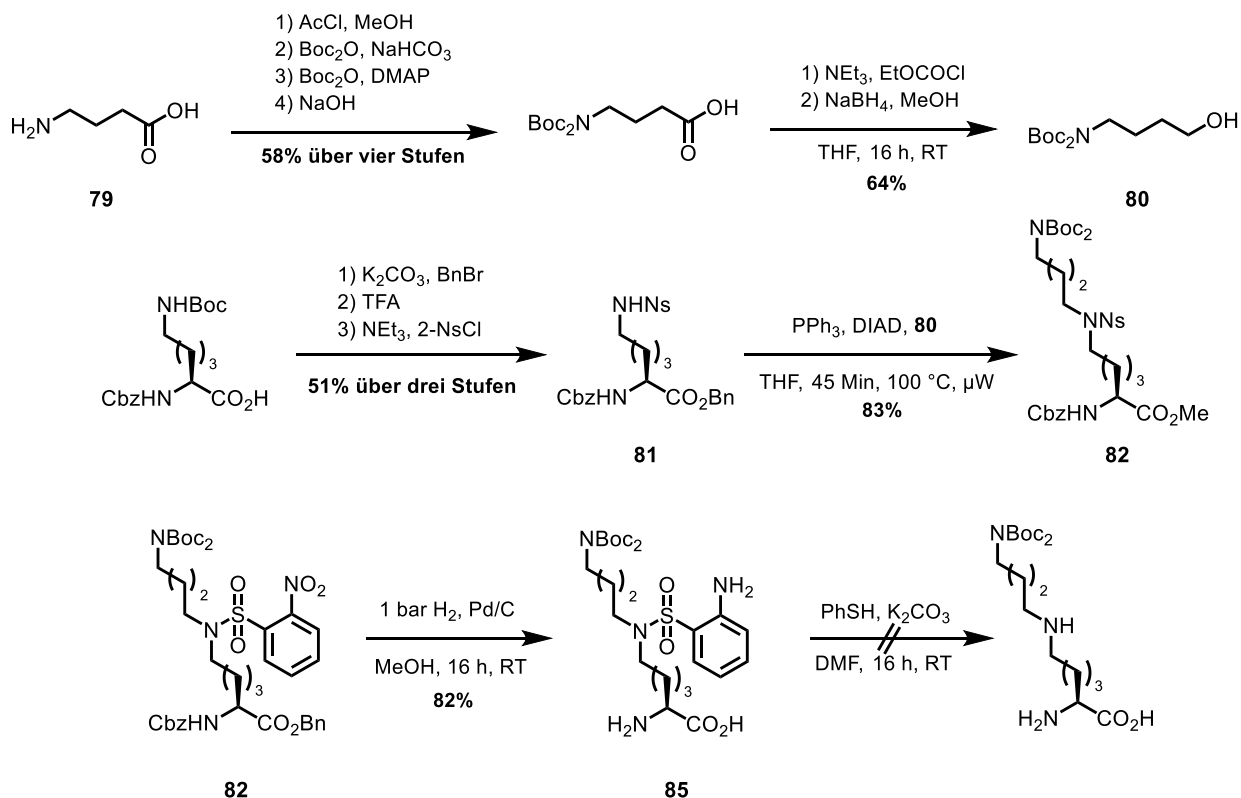


Testreaktion zum Schlüsselschritt



Schema 6-10: Testreaktion und Schlüsselschritt der retrosynthetischen Darstellung von Fmoc-L-Dhu(Boc, Boc₂)-OH mittels *Mitsunobu*-Reaktion. Das entsprechende 4-Amino-1-butanol Derivat **80** kann in einer literaturbekannten Route in fünf Stufen ausgehend von γ -Aminobuttersäure **79** erhalten werden. Die Alkylierung soll dann an einem ϵ -nosyliertem L-Lysin Derivat **81** erfolgen. Da die Testreaktion zwischen nosyliertem *n*-Propylamin **83** und dem 4-Amino-1-butanol Derivat **80** unter Mikrowellen-Bedingungen zu Verbindung **84** erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde dieser Ansatz weiter untersucht und auf das entsprechende ϵ -nosylierte L-Lysin Derivat **81** übertragen.

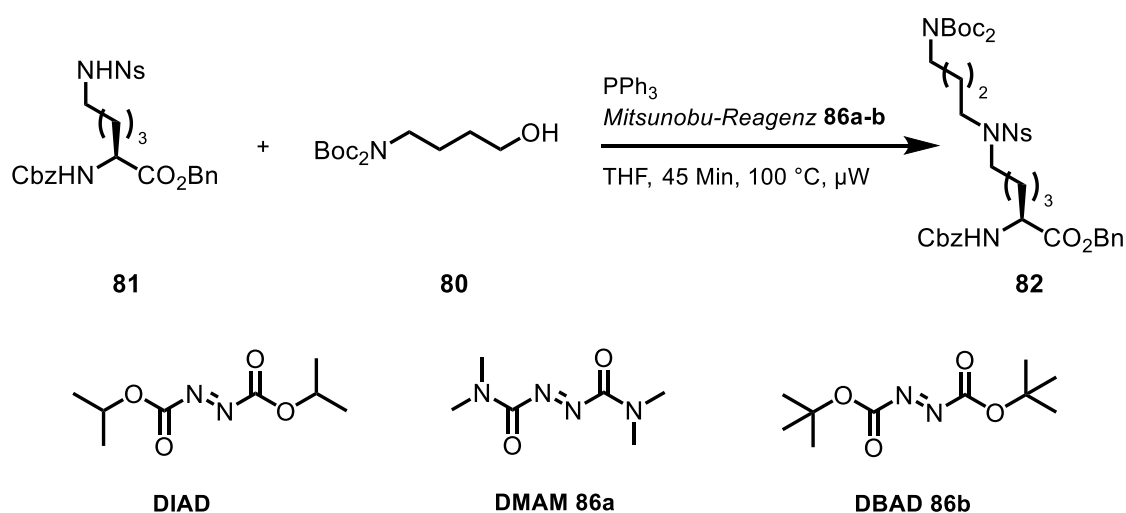
Schema 6-11 fasst die Schritte der Kettenverlängerung am entsprechenden L-Lysin Derivat **85** zusammen.



Schema 6-11: Kettenverlängerung vom L-Lysin-Derivat **81** zum entsprechenden L-Desoxyhypusin-Derivat **82**. Zweifach Boc-geschütztes 4-Amino-1-Butanol **80** kann in einer literaturbekannten Synthese von γ -Aminobuttersäure **79** erhalten werden. Schlüsselschritt dieser Route ist die *Mitsunobu*-Reaktion zwischen den Verbindungen **79** und **81**. Das entsprechende L-Desoxyhypusin-Derivat **82** konnte in guter Ausbeute und Reinheit erhalten werden. Eine hydrogenolytische Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen von **82** war nicht möglich, da gleichzeitig die Nitrogruppe der Nosyl-Schutzgruppe zum entsprechenden Anilin reduziert wurde. An dem Anilin-Derivat **85** konnte schließlich keine nukleophile aromatische Substitution mit Thiolen durchgeführt werden, um die Nosyl-Schutzgruppe abzuspalten. Daher musste die Schutzgruppenstrategie umgestaltet werden.

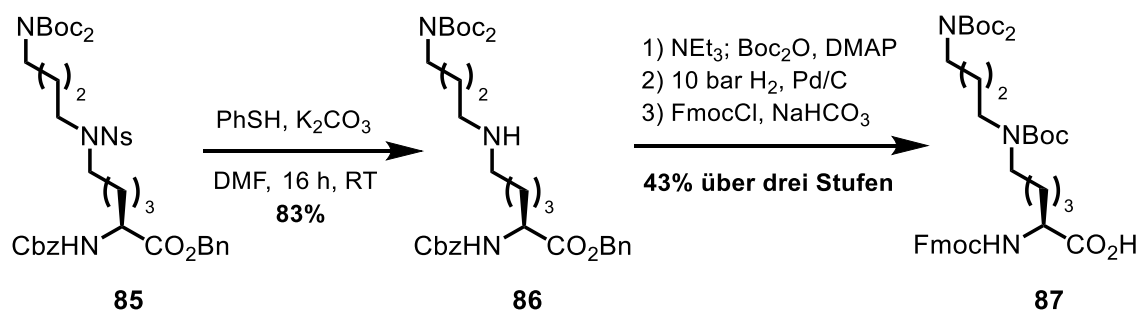
Ausgehend von γ -Aminobuttersäure **79** wurde zunächst der Methylester gebildet und anschließend das Amin unter nukleophiler Aktivierung zweifach Boc-geschützt. Verseifung des Esters lieferte die Carbonsäure in 58% Ausbeute über vier Stufen. Mittels Ethylchloroformiat (ECF) wurde das gemischte Anhydrid gebildet und darauffolgend mittels Natriumborhydrid zum 4-Amino-1-Butanol Derivat **80** reduziert.^[283–285] Das entsprechende Cbz-L-Lys(Ns)-OBn **81** wurde ausgehend von Cbz-L-Lys(Boc)-OH in drei Stufen mit 51% Ausbeute dargestellt.^[287,288] Die *Mitsunobu-Reaktion* als Schlüsselschritt dieser Syntheseroute wurde unter Mikrowellen-Bedingungen durchgeführt.^[289,290]

Die *Mitsunobu*-Reaktion in Lösung lieferte nach fünf Tagen Reaktionszeit vollständigen Umsatz, wobei das beim Einsatz von *Diisopropyl*diazocarboxylat (DIAD) als Reagenz das Produkt **82** auch noch säulenchromatographischer Aufreinigung noch mit dem entsprechenden Abbau-Produkt des Hydrazin-Dicarboxylats verunreinigt war. Nach Anwendung von Mikrowellen-Bedingungen (P_{\max} , 100 °C) konnte bereits nach 45 Minuten vollständiger Reaktionsumsatz mittels ¹H-NMR Analyse des Rohproduktes festgestellt werden.^[175,289–291] Das isolierte und aufgereinigte L-Desoxyhypusin-Derivat **82** war jedoch ebenfalls mit dem Hydrazin-Dicarboxylat verunreinigt. Es wurden weitere *Mitsunobu*-Reagenzien **86a-b** ausgetestet (Schema 6-12).



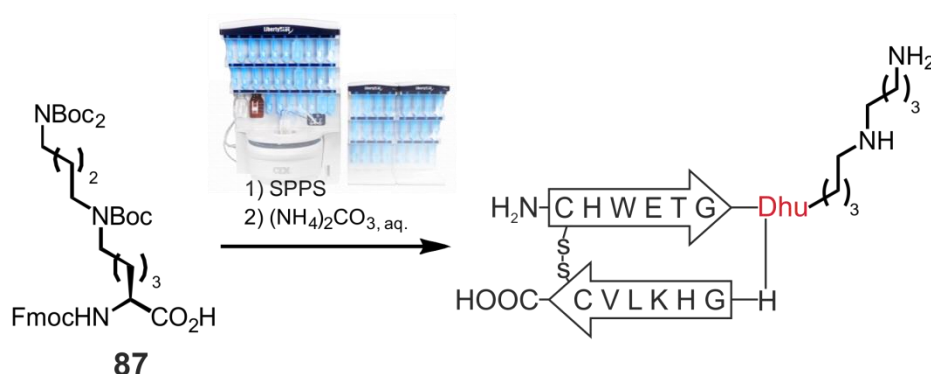
Schema 6-12: Optimierung der *Mitsunobu*-Reaktion: Unter Mikrowellen-Bedingungen konnte bereits nach 45 Minuten vollständiger Umsatz festgestellt werden. Durch den Einsatz von DBAD **86b** statt DIAD als Reagenz konnte das Produkt in identischer Ausbeute, jedoch ohne Hydrazin-Dicarboxylat Verunreinigung erhalten werden.

Mit Di-*tert*-butyl-diazocarboxylat (DBAD) **86b** konnte ein Reagenz gefunden werden, dass ebenfalls vollständigen Umsatz gewährleistete und dessen Abbauprodukt zusätzlich noch säulenchromatographisch abtrennbar war. Die hydrogenolytische Spaltung der Schutzgruppen von Cbz-L-Dhu(Boc, Ns)-OBn **82** lieferte neben der entschützten Aminosäure auch die Reduktion der Nitrogruppe der Nosyl-Schutzgruppe zum Anilin in Verbindung **85**. Aus diesem Grund musste die Schutzgruppenstrategie variiert werden. In einer nukleophilen, aromatischen Substitution wurde die Nosyl-Schutzgruppe mittels Thiophenol zu **86** abgespalten und anschließend das sekundäre Amin Boc geschützt. Hydrogenolytische Spaltung der Benzyl-Schutzgruppe und darauffolgende Fmoc-Schätzung des α -Amins lieferte schließlich das SPPS-kompatible Derivat **87** in einer Gesamtausbeute von 13% über zehn Stufen (längste lineare Synthese) erhalten werden (Schema 6-13).



Schema 6-13: Abspaltung der Nosyl-Schutzgruppe am sekundären Amin von Desoxyhypusin-Derivat **85**: Mittels nukleophiler, aromatischer Substitution wurde die Nosyl-Schutzgruppe in guter Ausbeute in **86** entfernt. Anschließend wurde das sekundäre Amin SPPS-kompatibel Boc-geschützt, es folgten die hydrogenolytische Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe, sowie die abschließende Fmoc-Schätzung des *N*-Terminus zu **87**.

Der erhaltene Baustein **87** wurde unter Standardbedingungen in der automatisierten Festphasenpeptidsynthese eingesetzt. Nach Abspaltung vom polymeren Träger wurde das Peptid in wässrigem Ammoniumcarbonat-Puffer zum intramolekularen Disulfid oxidiert (Schema 6-14).



Schema 6-14: Anwendung des erhaltenen Fmoc-L-Dhu(Boc₂, Boc)-OH **87** in der automatisierten Festphasenpeptidsynthese. Das Rohprodukt der Synthese wurde anschließend in wässrigem Ammoniumcarbonat-Puffer oxidiert, bevor das Oxidationsprodukt mittels *rp*-HPLC aufgereinigt und mittels NMR-Spektroskopie analysiert wurde.

Beim Einsatz des Bausteins **87** in der Peptidsynthese konnte festgestellt werden, dass dieser im Rahme der automatisierten Peptidsynthese keinerlei Reaktivität zeigte. Es konnte lediglich eine Deletionsmutante des gewünschten Peptids isoliert und charakterisiert werden. Daraufhin wurde Verbindung **87** komplett zu **88** entschützt (Schema 6-15), um diese im Jurkat Zellsystem untersuchen zu können (Abbildung 6-2).



Schema 6-15: Darstellung von komplett entschütztem H-L-Dhu-OH·3HCl **88**: Nach hydrogenolytischer Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen von Verbindung **87** wurden die Boc-Schutzgruppen mit HCl in Et₂O abgespalten, um den Einsatz zytotoxischer TFA zu vermeiden.

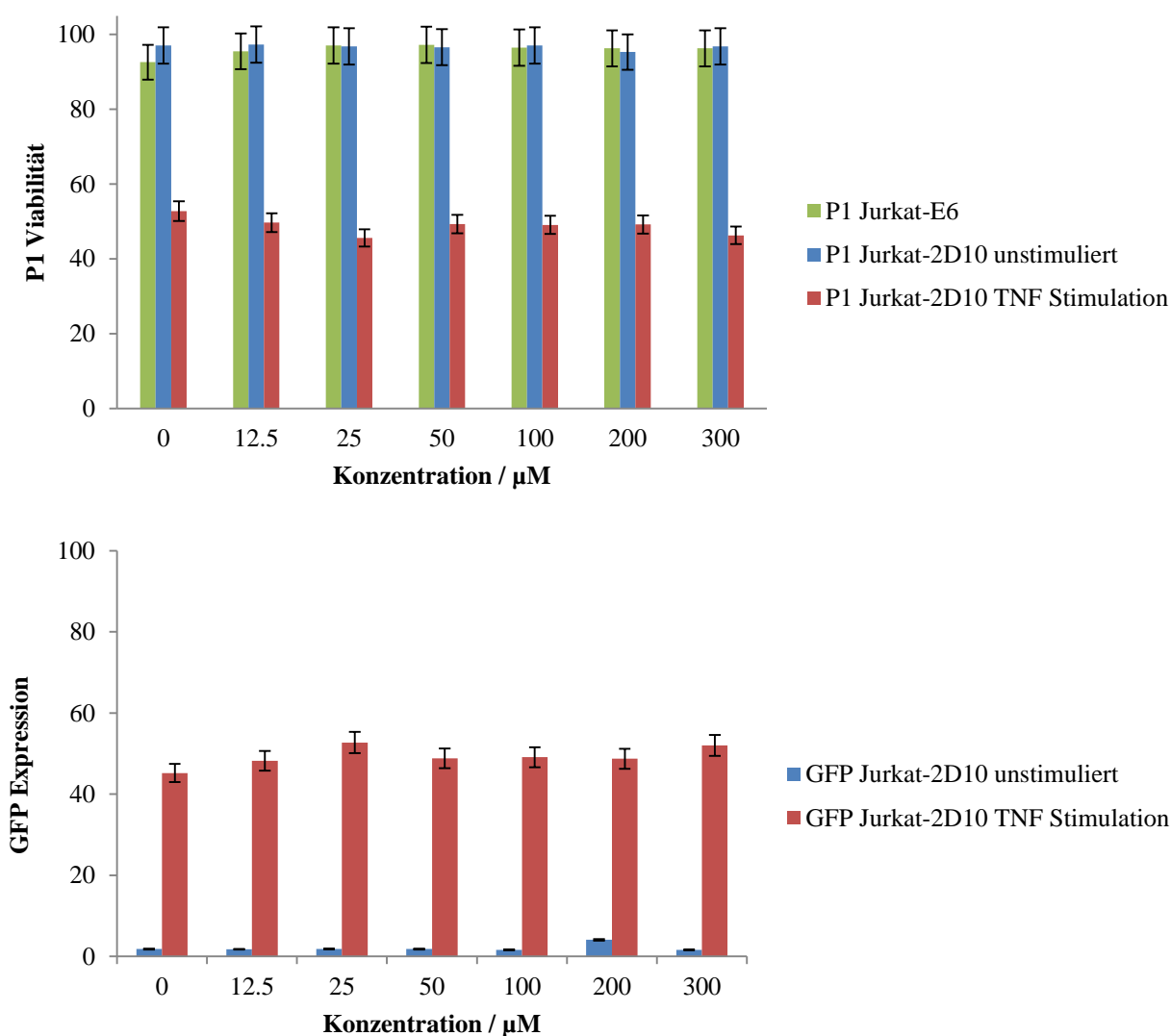


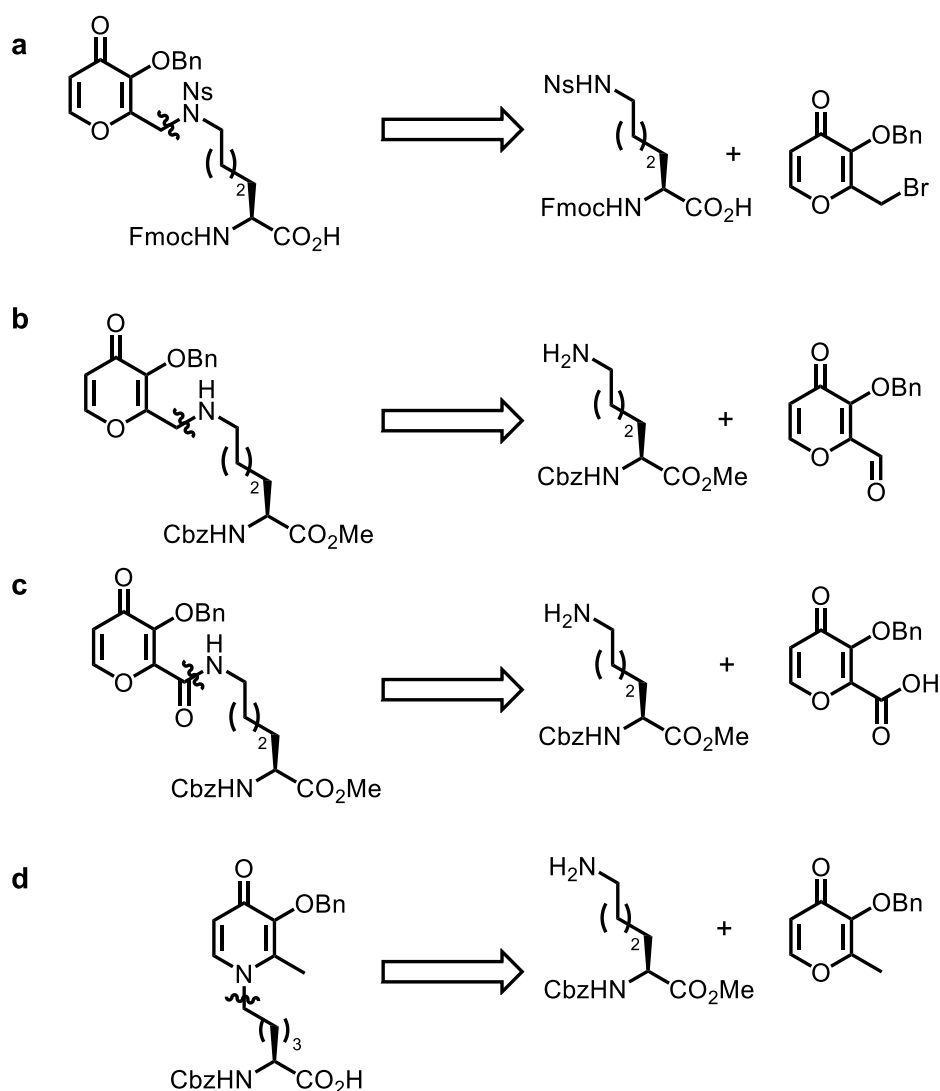
Abbildung 6-2: Untersuchung des Effekts von H-L-Dhu-OH·3HCl **88** im Jurkat 2D10-HIV System. Es wird deutlich, dass die Behandlung der Zellen mit Verbindung **88** keinen Effekt auf die GFP-Expression in unstimulierten, sowie TNF- α -stimulierten 2D10-Zellen und damit auf die Virusexpression hat. Es konnte keine

Zytotoxizität im DotBlot festgestellt werden. Die prozentualen Anteile sind aus der SSC vs. FSC Auftragung ausgelesen und unterscheiden sich nur unwesentlich von den Messwerten aus den B530A-Histogrammen.

6.3 Maltol Funktionalisierung der Lys⁷-Seitenkette

Die Inhibition der HIV-Aktivierung durch Thiomaltol **5**, als auch die bereits publizierten Ergebnisse mit Deferipron **4** und Thio-Deferipron **6**, legen den Ansatz der Funktionalisierung eines SPPS-kompatiblen Lysin-Derivats am ϵ -Amin durch entsprechende Heteroaromaten nahe, um peptidgesteuert selektiv den Metallchelator in die aktive Tasche der Hydroxylase bringen zu können.^[152,292] Retrosynthetisch sind dabei mehrere Ansätze denkbar, die nachfolgend diskutiert werden und in Schema 6-16 aufgezeigt sind. Es wurden insgesamt vier Methoden untersucht. Methode **a** basiert auf einer nukleophilen Substitution am ϵ -Amin von α -Fmoc geschütztes L-Lysin mit dem bromierten Maltol-Derivat. Um eine Überalkylierung des ϵ -Stickstoffs zu vermeiden und um diesen nukleophil zu aktivieren, sollte das ϵ -Amin nosyliert werden. Vorteil dieser Methode ist, dass direkt das Fmoc-geschützte Aminosäure-Derivat erhalten wird. Weiterhin kann die Nosyl-Schutzgruppe orthogonal an der Festphase mit Ethandithiol und DBU abgespalten werden, sodass keine Änderung der Schutzgruppenstrategie notwendig ist. Problematisch bei dieser Methode ist die radikalische Bromierung der exozyklischen Methylgruppe des Maltol-Derivats, da diese Derivate in nur mäßigen Ausbeuten darstellbar sind und zur Zersetzung neigen.^[135,293] Diese Bromierung ist nur für das Benzyl-geschützte Maltol-Derivat in der Fachliteratur^[294] beschrieben, sodass weitergehend eine Entschützungsreaktion des Benzylethers notwendig werden würde, um eine säurelabile Schutzgruppe kompartibel und orthogonal zur Strategie der Peptidsynthese einführen zu können. Methode **b** geht von einer allylischen Oxidation des geschützten Maltol-Derivats aus. Es wird ein Aldehyd erhalten, welcher dann in einer reduktiven Aminierung an das Lysin-Derivat angebracht werden sollte. Auch hier ist die allylische Oxidation nur für das Benzyl-Maltol literaturbekannt.^[295,296] Das entstehende sekundäre Amin muss in einem zusätzlichen Reaktionsschritt orthogonal zur Schutzgruppen-Strategie der Peptidsynthese geschützt werden. Ausgehend von dem Aldehyden kann Methode **C** untersucht werden, bei welcher der Aldehyd **94** zur Carbonsäure oxidiert wird. Diese kann dann in einer Peptidkupplung an das ϵ -Amin eines L-Lysin-Derivats gebunden werden. Dabei entsteht ein ungewöhnliches Strukturelement eines vinylogen α -Ketoamids über deren Stabilität in der Fachliteratur nur wenig bekannt ist. Um mögliche Nebenreaktionen an der Fmoc-Schutzgruppe in den Ansätzen **b** und **c** zu vermeiden, wird bei diesen Reaktionen zunächst das Cbz-geschützte L-Lysin-Derivat eingesetzt. Methode **d** basiert auf dem Ansatz einer

Aminolyse des Maltol-Derivats durch das freie ϵ -Amin des L-Lysin-Derivats. Diese Reaktion ist in der Fachliteratur bekannt und wurde bereits in dieser Arbeit zur Darstellung der modifizierten Deferipron-Derivate **4a-c** in Kapitel 3 erfolgreich angewandt. Problematisch bei dieser Reaktion ist die Notwendigkeit von hohen Temperaturen und einem basischen pH-Wert, was in einer Epimerisierung der α -Aminosäure resultieren könnte. Aufgrund des Einsatzes von nukleophilen Basen bei dieser Reaktion wird auch hier das α -Cbz-geschützte L-Lysin eingesetzt.

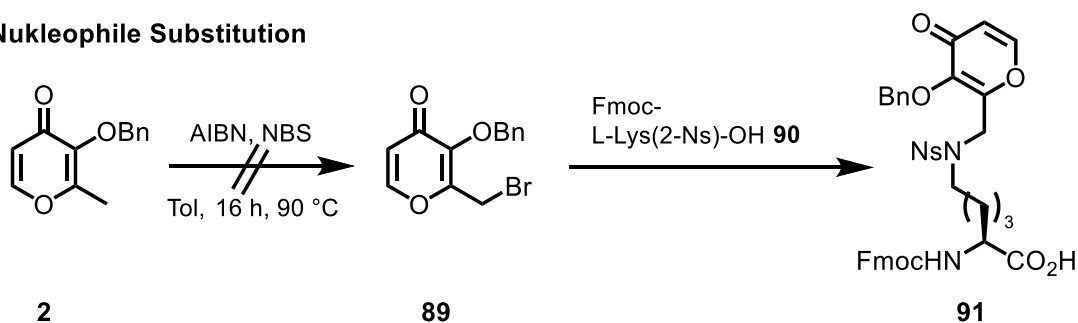


Schema 6-16: Retrosynthetische Ansätze zur Darstellung eines Maltol-funktionalisierten L-Lysin-Derivats zum Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese. **a:** Nukleophile Substitution an ϵ -Nosyl L-Lysin durch ein bromiertes Maltol-Derivat **89**. Die Nosyl-Schutzgruppe kann an der Festphase mittels Ethandithiol und DBU selektiv abgespalten werden.^[297,298] **b:** Reduktive Aminierung der L-Lysin-Seitenkette mit Aldehyd-funktionalisiertem Maltol-Derivat. Eine zusätzliche Einführung einer Schutzgruppe am entstehenden sekundären Amin wird notwendig. **c:** Oxidation des Aldehyden zur Carbonsäure ermöglicht deren Kupplung an die Seitenkette des L-Lysins. Es entsteht ein vinyloges α -Ketoamid, über dessen Stabilität wenig bekannt ist. **d:** Die Aminolyse von

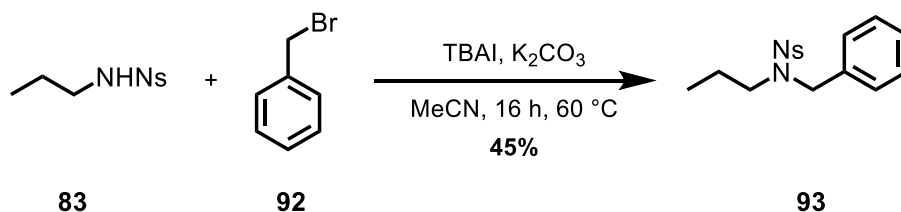
Benzyl-Maltol und primären Amin ist bereits literaturbekannt und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht.^[299–301]

Nachfolgend werden diese vier Routen mit ihrem jeweiligen Schlüsselschritt untersucht. Dabei wurde der Schlüsselschritt in entsprechenden Testreaktionen auf kommerziell erhältliche Substrate vereinfacht, um direkt eine Aussage über den Erfolg dieser Methode zu erhalten ohne dafür in einer aufwändigen, mehrstufigen Synthese erst das entsprechend orthogonal-geschützte Aminosäure-Derivat darstellen zu müssen (Schema 6-17).

Nukleophile Substitution



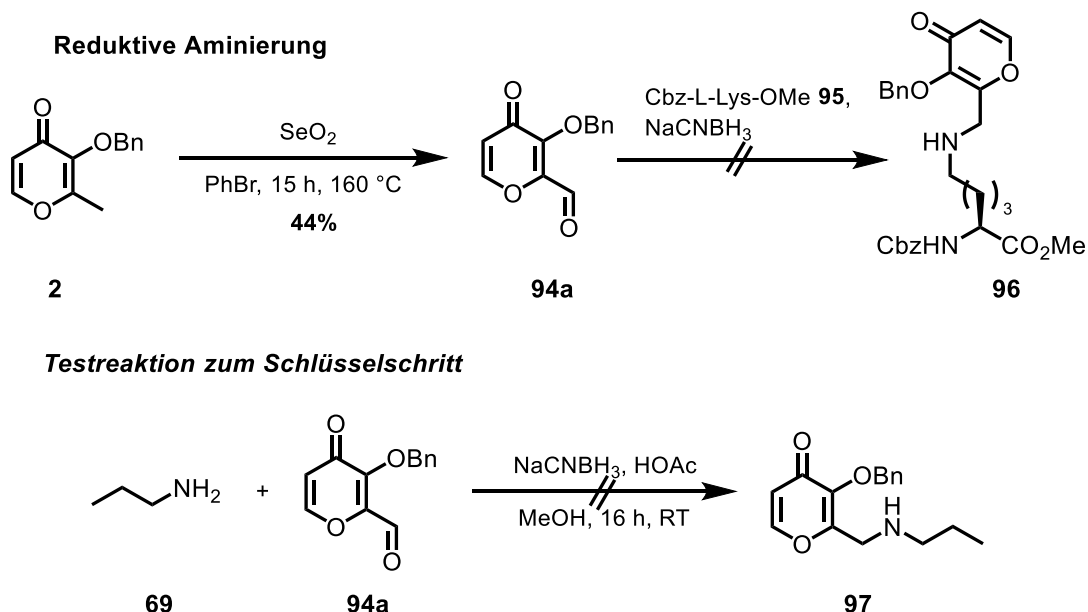
Testreaktion zum Schlüsselschritt



Schema 6-17: Untersuchungen zur nukleophilen Substitution: Das bromierte Maltol-Derivat **89** konnte nicht erfolgreich dargestellt werden. Die Testreaktion zwischen nosyliertem *n*-Propylamin **83** und Benzylbromid **92** konnte mit mäßiger Ausbeute durchgeführt werden.

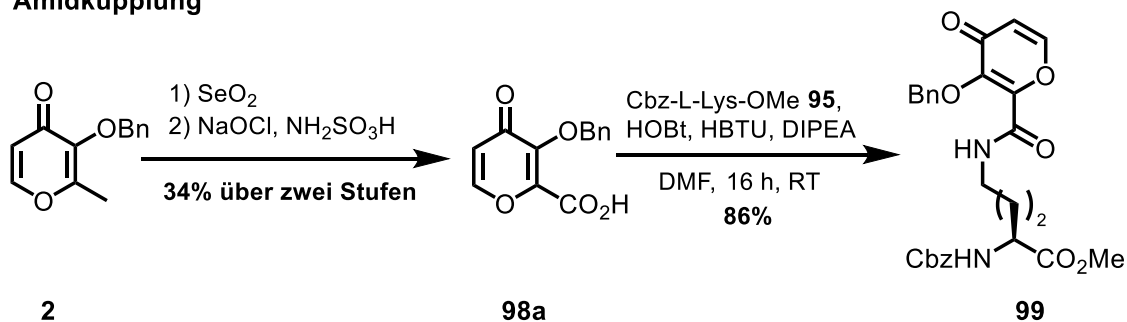
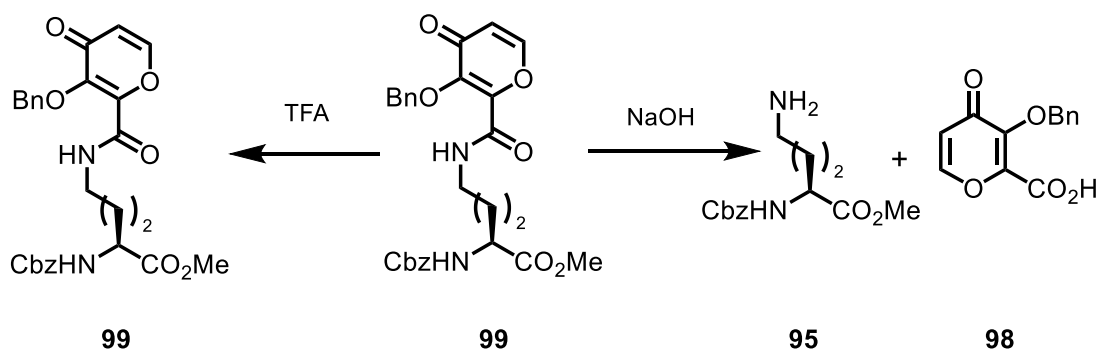
Der Ansatz der nukleophilen Substitution (Schema 6-17) beginnt mit einem geschützten Maltol-Derivat, hier Benzyl-Maltol **2**. Dieses wurde für die Untersuchung dieser Syntheseroute gewählt, da die auf die Benzyl-Schätzung folgende radikalische Bromierung der exozyklischen Methylgruppe mit Azo-*bis*(isobutyronitril) (AIBN) und *N*-Bromsuccinimid (NBS) zu **89** bereits in der Fachliteratur beschrieben wurde.^[295] Die anschließende nukleophile Substitution sollte an einem Nosyl-aktivierten ε-Stickstoff eines orthogonal-geschützten L-Lysin-Derivats **90** durchgeführt werden, jedoch konnte schon die Bromierung nicht in ausreichender Ausbeute reproduziert werden, was unter Umständen auf die mangelnde Qualität des Radikalstarters zurückzuführen ist. Nichtsdestotrotz wurde die entsprechende Testreaktion aus nosyliertem *n*-Propylamin **83** und Benzylbromid **92** mit mäßiger Ausbeute mit mäßiger Ausbeute erfolgreich durchgeführt. Da aber das entsprechende

Maltol-Derivat **89** nicht dargestellt werden konnte, wurde als zweite Syntheseroute eine reduktive Aminierung **b** untersucht (Schema 6-18).



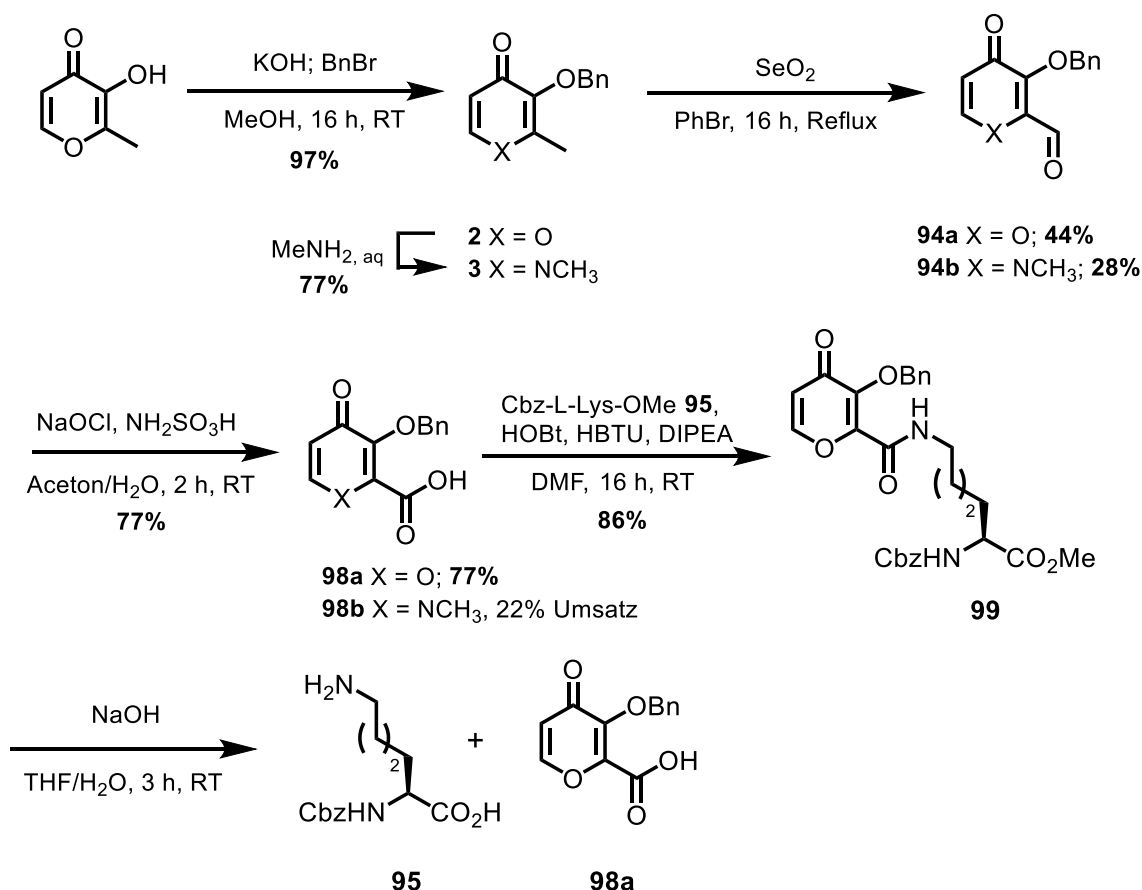
Schema 6-18: Untersuchungen zur reduktiven Aminierung: *Rayleigh-Oxidation* von Benzyl-Maltol **2** lieferte den Aldehyden **94a**, welcher anschließend mit Cbz-L-Lys-OMe **95** und Natriumcyanoborhydrid zu Verbindung **96** reduktiv aminiert werden sollte. Die Testreaktion zwischen *n*-Propylamin **69** und dem Aldehyden **94** zeigte keinen Umsatz.

Auch diese Syntheseroute startete beim Benzyl-geschützten Maltol **2**. Mittels Selendioxid konnte die exozyklische Methylgruppe in einer *Rayleigh-Oxidation* zum Aldehyden **94a** in 44% Ausbeute oxidiert werden. Dieser sollte im Anschluss mit dem ϵ -Amin eines orthogonal geschützten Lysin-Derivats, hier Cbz-L-Lys-OMe **95**, und Natriumcyanoborhydrid bzw. Natrium(trisacetoxy)borhydrid zu Verbindung **96** reduktiv aminiert werden. Als Testreaktion diente hierbei die reduktive Aminierung des Aldehyden **94a** mit *n*-Propylamin **69**. Das entsprechende sekundäre Amin **97** konnte nicht isoliert, jedoch konnte beide Edukte reisoliert werden, was auch diese Syntheseroute uninteressant werden ließ. Eine Oxidation des Aldehyds konnte dabei nicht beobachtet werden. Da jedoch der Aldehyd **69** in akzeptabler Ausbeute dargestellt werden konnte, wurde mit der Amidkupplung **c** eine weitere mögliche Syntheseroute studiert, welche in Schema 6-19 dargestellt ist.^[302]

Amidkupplung**Testreaktion zur Stabilität des Strukturelements**

Schema 6-19: Untersuchungen zur Amidkupplung: Hypochlorit-Oxidation des Aldehyden **94a** lieferte die Benzyl-geschützte Carbonsäure **98a**, welche mit HOBt und HBTU erfolgreich an Cbz-L-Lys-OMe **95** gekuppelt werden konnte. Das entstehende Strukturelement des vinylogenen α -Ketoamids **99** zersetzte sich bei der basischen Hydrolyse des Methylesters und lieferte die beiden Edukte **95** und **98**.

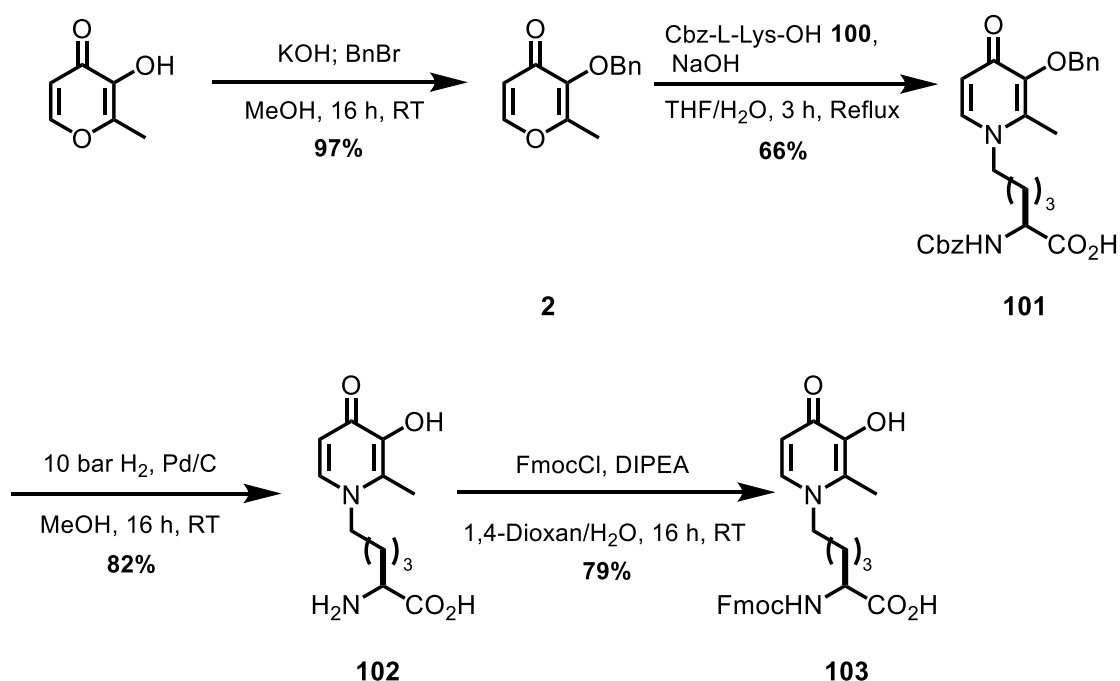
Bei der Route der Amidkupplung kam der bereits synthetisierte Aldehyd **94a** zum Einsatz. Dieser wurde mit Hilfe von Natriumhypochlorit und Amidosulfonsäure zur entsprechenden Carbonsäure **98a** oxidiert werden. Diese Carbonsäure wurde nun in einer Peptid-Kupplung an Cbz-L-Lys-OMe **95** an das freie ϵ -Amin gekuppelt. Diese Synthese konnte erfolgreich durchgeführt werden und wird nachfolgend in Schema 6-20 detailliert erläutert.



Schema 6-20: Syntheseroute zur Amidkupplung: Benzyl-Maltol **2** wurde zunächst in allylischer Position oxidiert und der erhaltene Aldehyd **94a** in das Carbonsäure-Derivat **94a** überführt. Anschließend Kupplungsreaktion an Cbz-L-Lys-OMe **95** lieferte **99**. Verbindung **99** zeigte aber nur ungenügende Basenstabilität, sodass dieses Strukturelement nicht in der Peptidsynthese angewendet werden kann. Die Syntheseroute wurde für die entsprechenden Deferipron-Derivate von **3** wiederholt, wobei gefunden werden konnte, dass die Oxidation von **94b** zur Carbonsäure **98b** mit unzureichendem Umsatz erfolgte.

Der nach *Rayleigh-Oxidation* erhaltene Aldehyd **94a** wurde mit Natriumhypochlorit und Amidosulfonsäure erfolgreich in einer guten Ausbeute zur Carbonsäure **98a** oxidiert. Diese konnte dann mit guter Ausbeute an das ε-Amin von Cbz-L-Lys-OMe **95** gekuppelt werden. Die *Rayleigh-Oxidation* konnte ebenfalls für das Benzyl-geschützte Deferipron **94b** durchgeführt werden, jedoch lieferte diese Reaktion deutlich niedrigere Ausbeuten im Vergleich zum Maltol-Derivat **94a**. Die Oxidation des Deferipron-Aldehyds **94b** lieferte keinen vollständigen Umsatz und die erhaltene Carbonsäure konnte nicht sauber von dem Aldehyden abgetrennt werden. Daher wurde die Amidkupplung nur für das Maltol-Derivat **98a** untersucht, die entsprechende Aminolyse mit wässriger Methyamin-Lösung könnte zu einem späteren Zeitpunkt der Baustein-Synthese durchgeführt werden. Da bei der Amidkupplung von der Carbonsäure **98a** an das Amin von **95** ein ungewöhnliches

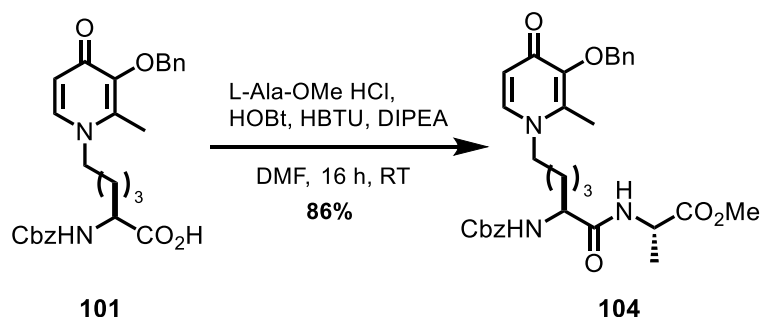
Strukturelement eines vinylogenen α -Ketoamids entsteht, wurde dessen pH-Wert Stabilität NMR-spektroskopisch untersucht. Bereits bei der darauffolgenden Reaktion der Verseifung des C-terminalen Methylesters von Verbindung **99** konnte mittels ¹H-NMR-Spektroskopie festgestellt werden, dass die gebildete Amidbindung gebrochen wurde. Es wurden das Lysin-Derivat **98** und die Carbonsäure **95** in quantitativer Ausbeute reisoliert. Zwar ließ diese Syntheseroute die Möglichkeit einer alternativen C-terminalen Schutzgruppe, wie beispielsweise einem Benzylester, offen, jedoch wurde dies nicht weiter untersucht, da die Spaltung des vinylogenen α -Ketoamids auch bei der basischen Disulfid-Oxidation der formstabilen β -hairpin Peptide zum Verlust des niedermolekularen Wirkstoffs führen würde. Methode **d** führte schließlich zur Fmoc-geschützten Aminosäure, welche direkt in der Peptidsynthese eingesetzt werden konnte. Testreaktionen waren bei dieser Strategie nicht notwendig, da die Aminolyse bereits ausreichend während der Synthese der modifizierten Deferipron-Derivate **4a-c** in Kapitel 3 untersucht wurde. Die Synthese dieses Fmoc-geschützten Aminosäure-Bausteins ohne Schutzgruppe in der Seitenkette ist in Schema 6-21 aufgezeigt.



Schema 6-21: Syntheseroute zur Aminolyse: Ausgehend von Benzyl-Maltol **2** und Cbz-L-Lys-OH **100** wurde Verbindung **101** erhalten. Hydrogenolytische Abspaltung beider benzyllischen Schutzgruppen und anschließende Fmoc-Schützung liefert den SPPS-Baustein **103**.

Ausgehend von Benzyl-geschütztem Maltol **2** wurde die Aminolyse an α -Cbz geschütztem L-Lysin **100** durchgeführt. Aufgrund des Einsatzes von NaOH als Base bei der Aminolyse wurde auf eine C-terminale Schutzgruppe verzichtet. Verbindung **101** konnte in 66% Ausbeute erhalten werden. Bei der Aminolyse mit einem TBS-geschützten Maltols wurde die Abspaltung der Silyl-Schutzgruppe beobachtet. Es folgten die hydrogenolytische Spaltung des Benzylethers, sowie des Benzylcarbamats und die anschließende Fmoc-Schätzung des *N*-Terminus lieferte den Baustein zur Peptidsynthese **103** in einer Gesamtausbeute von 41% über vier Stufen ohne Berücksichtigung der Synthese des L-Lysin Derivats **100**. Nachfolgend wird diese Aminosäure als L-Maltosin (Mal) bezeichnet.

Da es bei der baseninduzierten Aminolyse von Benzyl-Maltol mit dem ϵ -Amin des Lysins zur Epimerisierung der α -Aminosäure kommen kann, wurde mit Verbindung **103** eine Dipeptid-Synthese durchgeführt. Dazu wurde das Dipeptid **104** aus **101** und L-Ala-OMe synthetisiert, was in Schema 6-22 gezeigt ist.



Schema 6-22: Darstellung des Cbz-Mal-Ala-OMe Dipeptids **104**.

Sollte die vorherige Reaktion zu einer Epimerisierung oder gar einer Racemisierung des Lysins gekommen sein, sollten in der Dipeptid-Kupplung zwei Diastereomere zu isolieren sein. Aus den Integralverhältnissen der amidischen Protonen oder der β -Protonen des L-Alanins im ¹H-NMR Spektrum kann somit das Diastereomeren-Verhältnis bestimmt werden. Unter der Annahme, dass während der Peptidkupplung keine Stereoinformation des L-Alanins verloren geht, entspricht dieses Diastereomerenverhältnis *dr* dem Enantiomerenverhältnis *de* des synthetisierten Aminosäure-Derivats **101**. Aus diesem Verhältnis kann wiederum der Enantiomerenüberschuss *ee* bestimmt werden.

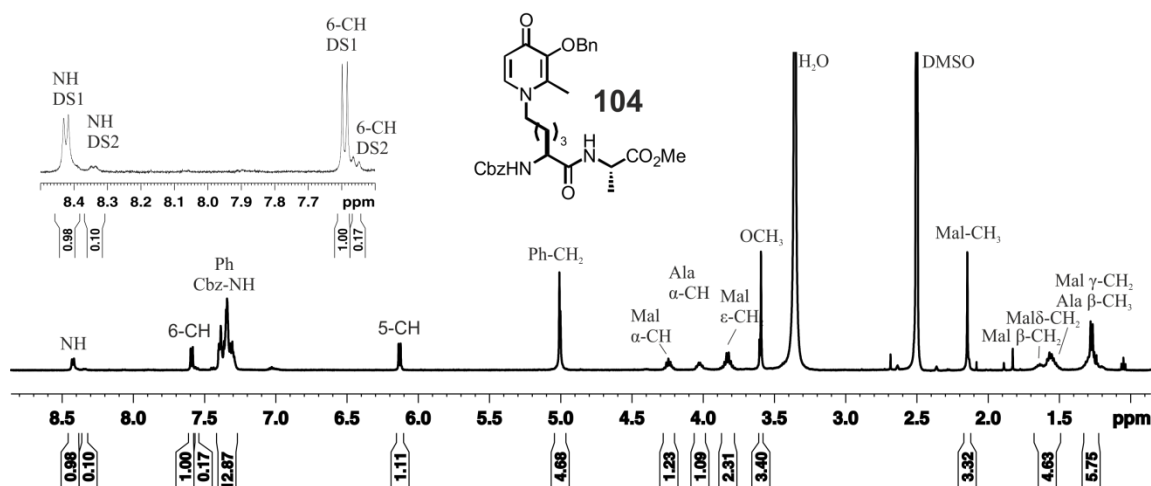


Abbildung 6-3: NMR-spektroskopische Zuordnung der Dipeptid-Kupplung **104**: Aus dem Integralverhältnis der amidischen Protonen kann das Diastereomeren-Verhältnis und daraus das Enantiomerenüberschuss bestimmt werden.

Aus den Integralverhältnissen des amidischen Protons, sowie des 6-CH des Maltols kann ein Diastereomeren-Verhältnis von 9:1 bestimmt werden, was einem Enantiomeren-Überschuss von 80% entspricht. Demnach wurden 20% der Stereoinformation des Maltosin-Derivats verloren. Dies kann unter dem Aspekt akzeptiert werden, dass der Einbau dieser Aminosäure im β -hairpin Peptid an der Hypusinierungsstelle des Lysins⁵⁰ an der *i+1*-Position im *turn*-Bereich erfolgen sollte. Da diese Position und damit auch die Sekundärstruktur des Peptids sehr sensibel auf die Inversion der Stereochemie reagiert, sollten beide erhaltene Diastereomere mittels HPLC voneinander aufgetrennt werden. Die Aminosäure **103** wurde unter den im experimentellen Teil beschriebenen Standardbedingungen für die Kupplung an vorbeladenem 2-Chlorotritylharz in der automatisierten Festphasenpeptidsynthese eingesetzt. Die Sequenz wurde hier analog zu Peptid **P2** gewählt, mit der Ausnahme, dass Lys⁷ zu Mal⁷ modifiziert wurde. Nach HPLC-Analyse wurde das Peptid **P37**, wie bereits für die Peptide zuvor beschrieben, in wässrigem Ammoniumcarbonat-Puffer intramolekular zum Disulfid oxidiert. Abbildung 6-4 zeigt das ¹H-NMR-Spektrum des Peptids **P37**, welches nach Disulfid-Oxidation und HPLC Aufreinigung in der Peptidsynthese mit dem Maltosin-Baustein **104** erhalten wurde. Es wird deutlich, dass die Dispersion im amidischen Bereich des Peptids **P37** im Vergleich zum Peptid **P2** geringer ist. Weiterhin sind die Methylsignale der Aminosäuren Leu¹² und Val¹³ stark hochfeldverschoben. Auch die Dispersion der Trp³-Seitenkette, wie sie für die Ausbildung eines hydrophoben Clusters erwartet wird und bereits charakterisiert werden konnte, bleibt aus. Nach einem *sequential walk* in den TOCSY- und NOESY-Spektren des Peptids **P37** konnte dieses Peptid als die Deletionsmutante Δ Mal⁷ identifiziert werden. Durch das Fehlen dieser Aminosäure kommt es nicht mehr zur Ausbildung einer

stabilen β -hairpin Struktur, was die geringe Dispersion der amidischen Signale, sowie die Hochfeldverschiebung der Seitenketten der aliphatischen Aminosäuren erklärt.^[303] Dies kann weiterhin dadurch bestätigt werden, dass die β -hairpin charakteristische Tieffeldverschiebung für das α -Proton der $i+4$ Aminosäure, hier His¹⁰ ausbleibt. Auch der Temperaturgradient der NH-Signale des Peptids zeigen nicht das β -hairpin typische alternierende Muster zwischen großen und kleinen Temperaturgradienten. Massenspektrometrische Untersuchungen bestätigen ebenfalls, dass es sich bei diesem Peptid um die Deletionsmutante **P37** handelt.^[302]

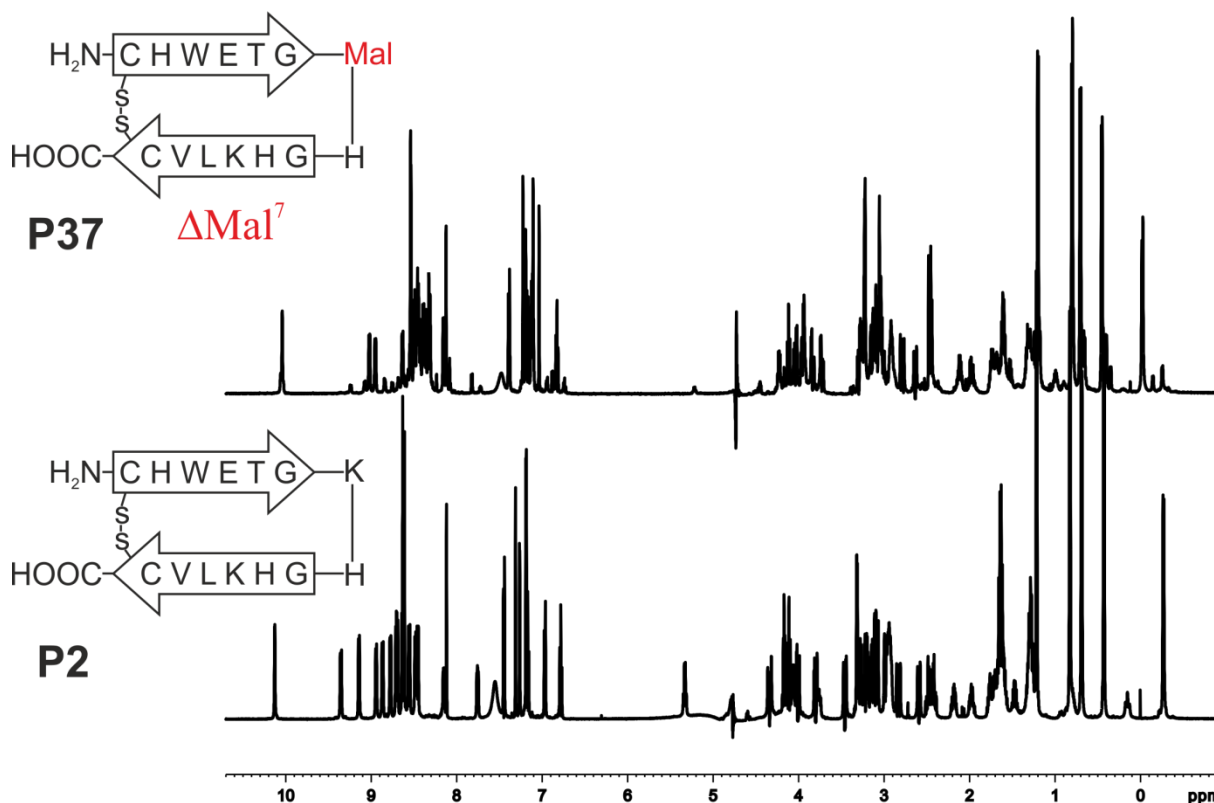
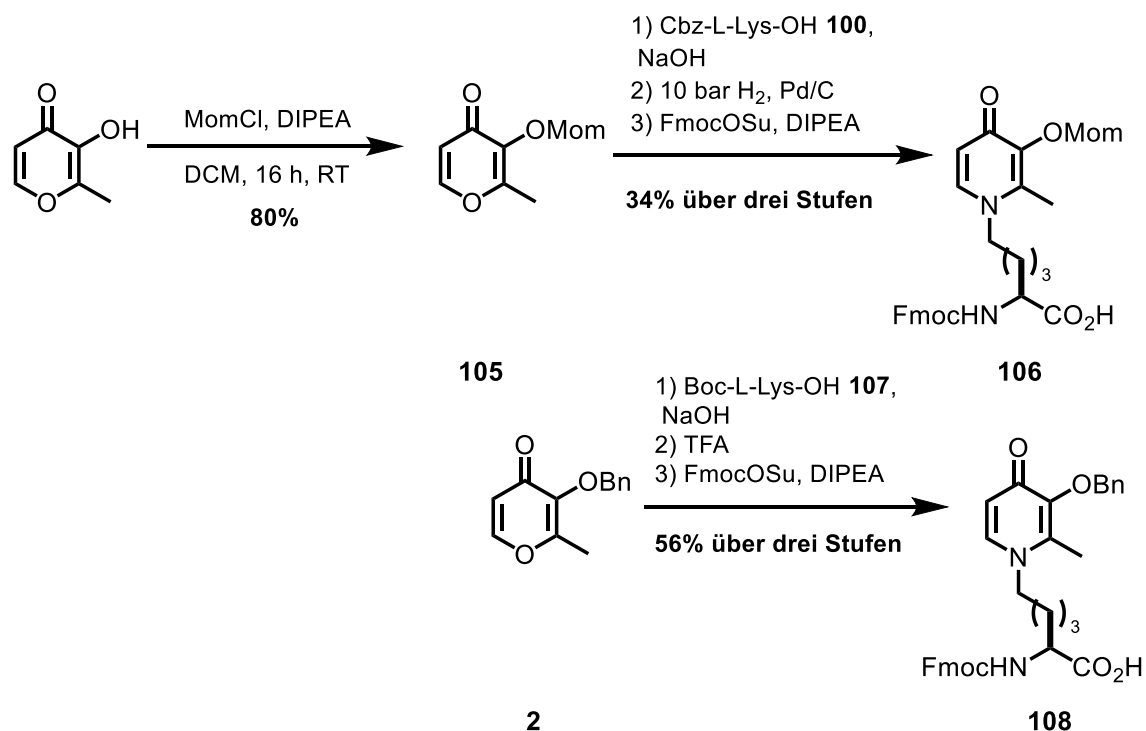


Abbildung 6-4: Vergleich der NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1) der Deletionsmutante **P37** im Vergleich zum Peptid **P2**.

Die Aminosäure **103** zeigte also keinerlei Reaktivität in der Peptidsynthese. Auch mit modifizierten Syntheseprogrammen, wie höherer Temperatur oder Wechsel des Lösungsmittels von DMF zu DMSO:Toluol (3:1) lieferten ebenfalls nur die Deletionsmutante. Die Vermutung liegt nahe, dass die Abwesenheit einer Schutzgruppe in der Seitenkette von Verbindung **103** einen Einfluss auf deren Reaktivität in der Peptidsynthese haben könnte. Daher wurde eine weitere Syntheseroute entwickelt, um eine säurelabile Schutzgruppe in der Seitenkette des Maltosins zu erhalten. Da das entsprechende *tert*-butyl-Carbonat des Maltols schon während der NMR-Analyse in DMSO-d₆ partiell hydrolysierte, wurde das Methoxymethyl-Acetal (Mom) als Schutzgruppe angewandt. Die Synthese erfolgte analog zur

Synthese von **101** in Schema 6-21 mit dem Unterschied, dass statt Benzyl-Maltol **2** nun Mom-Maltol **105** eingesetzt wurde. **105** wurde aus der Alkylierung von Maltol mit Chlormethylmethylether erhalten. Schema 6-23 fasst die Synthese zusammen. Da auch in dieser Peptidsynthese erneut nur die Deletionsmutante ΔLys^7 **P37** isoliert werden konnte, wurde zusätzlich das L-Maltosin-Derivat **108** synthetisiert, welches eine Benzyl-Schutzgruppe in der Seitenkette trägt. Im Unterschied zur vorherigen Schutzgruppenstrategie wurde die Aminolyse hier von Boc-L-Lys-OH **107** an Benzyl-Maltol **2** durchgeführt. Dabei wurde eine deutlich bessere Gesamtausbeute als beim Mom-Derivat **106** erreicht.



Schema 6-23: Darstellung der alternativ geschützten Maltosin-Derivate: Seitenketten Mom-geschütztes Mal **106** für die SPPS konnte ausgehend von Mom-Maltol **105** und Cbz-L-Lys-OH **100** erhalten werden. Jedoch zeigte auch dieses Derivat keinerlei Reaktivität beim Einsatz in der Peptidsynthese. Das Benzyl-Derivat **108** hingegen, welches ausgehend von Benzyl-Maltol **2** und Boc-L-Lys-OH **108** erhalten wurde, konnte erfolgreich in die Peptidstruktur eingebracht werden.

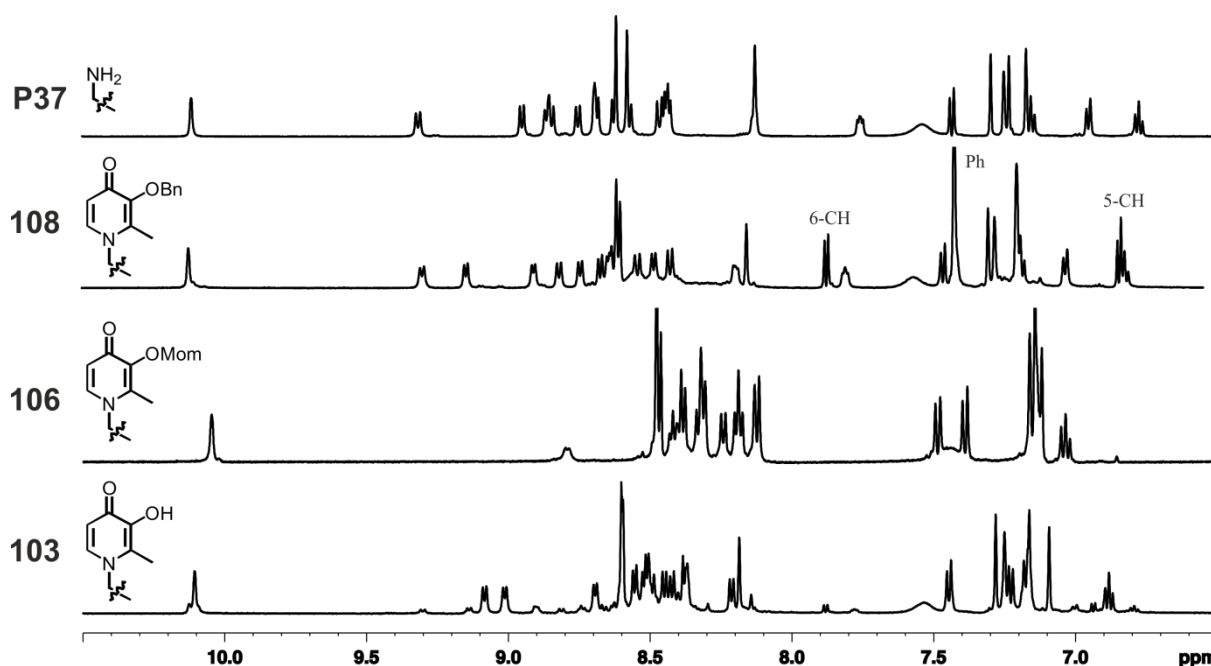
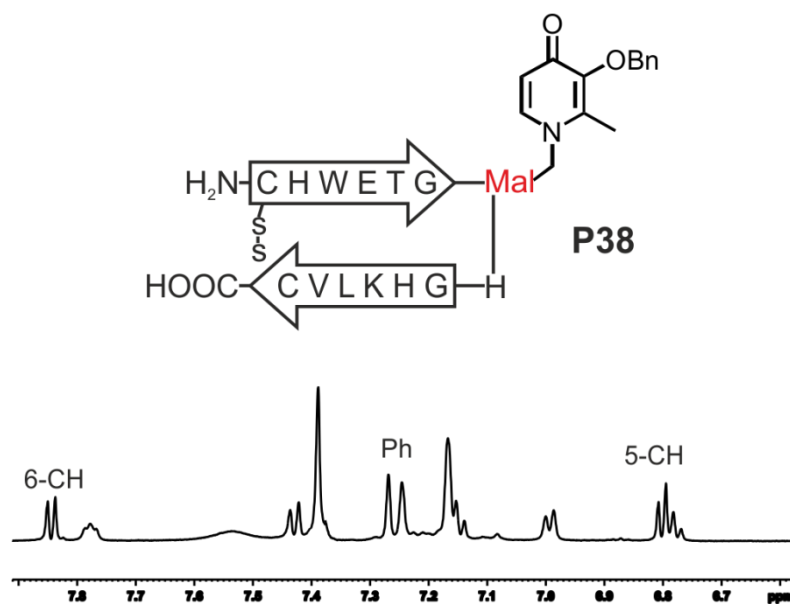


Abbildung 6-5: Ausschnitte der amidischen Bereiche (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1) der synthetisierten Mal⁷-haltigen Peptide **P37**: Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz ohne Schutzgruppe oder mit MOM-Schutzgruppe des Maltols zu keinerlei Reaktivität in der Peptidsynthese führte, sodass lediglich die Deletionsmutante isoliert werden konnte. Für die Benzyl-Schutzgruppe in **108** konnte das Maltosin-beinhaltende Peptid erfolgreich isoliert werden.

Abbildung 6-5 zeigt die nach Disulfid-Oxidation und HPLC Aufreinigung erhaltenen Peptide, bei der der jeweils an der linken Seite gezeigter Aminosäure-Baustein eingesetzt wurde. Im Vergleich mit der Deletionsmutante Δ Mal⁷ **P37** (unteres Spektrum) und dem Lys⁷-Peptid **P2** (oberes Spektrum) wird deutlich, dass bei Einsatz des Mom-geschützten Derivats **106** nicht das gewünschte Peptid erhalten werden konnte. Hingegen beim Benzyl-geschützten Maltosins **108** sind die aromatischen Signale der Ether-Schutzgruppe und des Maltols erkennbar. Die Stabilität der Seitenketten-Schutzgruppe des Maltosins hat also einen erheblichen Einfluss auf die Reaktivität in der Peptidsynthese. Die hydrogenolytische Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe im oxidierten Peptid **P38** führte allerdings zur Zersetzung des Peptids.

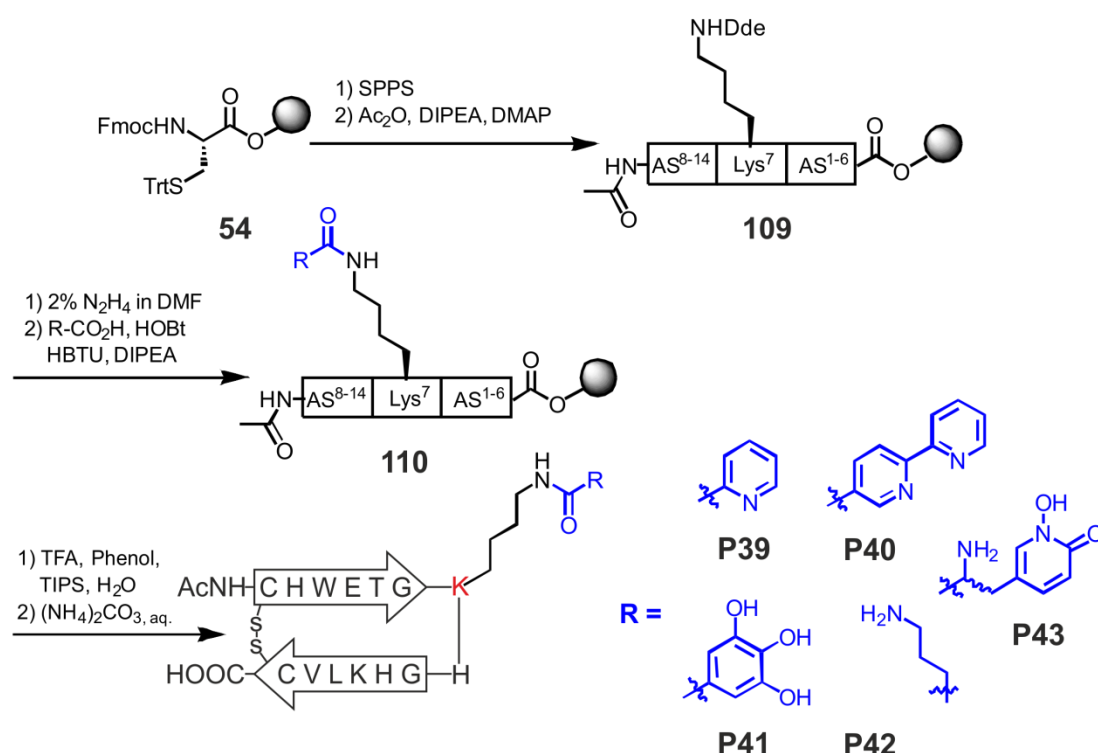


Schema 6-24: Struktur und ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1) des Peptids **P38**: Die Anwesenheit der Maltosin-Seitenkette, sowie der benzylichen Schutzgruppe kann eindeutig bestätigt werden.

Die Faltungspopulation von **P38** im Vergleich zu **P2** ist durch die Seitenketten-Modifikation nahezu unverändert. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Menge des Peptids konnte die Abspaltung der Schutzgruppe nicht weiter optimiert werden.

6.4 Modifizierungen von Lys⁷-Seitenkette an der Festphase

Eine Funktionalisierung der Lys⁷-Seitenkette an der Festphase wurde untersucht, um eine Funktionalisierung dieser Position zu ermöglichen ohne dabei immer den entsprechenden Fmoc-geschützten Lysin-Baustein synthetisieren zu müssen. Die generelle Vorgehensweise ist in Schema 6-25 gezeigt. Ausgehend von Fmoc-L-Cys(Trt)-OH beladenem 2-Chlortrityl-Harz **54** wurde zunächst das Peptid unter Standardbedingungen synthetisiert, wobei Lys⁷ als Fmoc-L-Lys(Dde)-OH eingesetzt wurde. Es folgte eine Acetylierung des *N*-Terminus, bevor mittels Hydrazinolyse die Dde-Schutzgruppe abgespalten wurde.



Schema 6-25: Darstellung der an Lys⁷ seitenkettenmodifizierter β -hairpin Peptide. Lys⁷ wird in der Festphasenpeptidsynthese als Fmoc-L-Lys(Dde)-OH eingesetzt, was die orthogonale Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppe **109** ermöglicht. Nach Acetylierung des *N*-Terminus wird die Dde-Schutzgruppe mittels Hydrazinolyse abgespalten und das entsprechend geschützte Carbonsäure-Derivat an das ϵ -Amin gekuppelt **110**. Abspaltung vom Harz und Disulfid-Oxidation erfolgen wie zuvor bereits beschrieben.

Mit den Kupplungsreagenzien HOBt und HBTU wird das entsprechende Carbonsäure-Derivat an das ϵ -Amin der Seitenkette von Lys⁷ in **109** gebracht. Die Abspaltung vom Harz von **110** erfolgt dann unter Standardbedingungen. Es wurden verschiedene Carbonsäuren in der Synthese angewendet. Als ersten Ansatz wurde Nikotinsäure **111** in die Seitenkette von Lys⁷ eingebracht, da hierbei auf ein kommerziell erhältliches Reagenz zurückgegriffen werden

konnte. Zusätzlich waren keine weiteren Schutzgruppen am Carbonsäure-Substrat notwendig, sodass problemlos mit diesem Ansatz der Erfolg dieser Synthesestrategie überprüft werden konnte. Nach Disulfid-Oxidation wurde das Rohpeptid im wässrigen Ammoniumcarbonat-Puffer oxidiert. Es folgte HPLC Aufreinigung und die Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie. Der amidische Bereich des ¹H-NMR Spektrums des Nikotinsäure-Peptids **P39** ist in Abbildung 6-6 gezeigt. Die Synthese konnte erfolgreich durchgeführt werden.

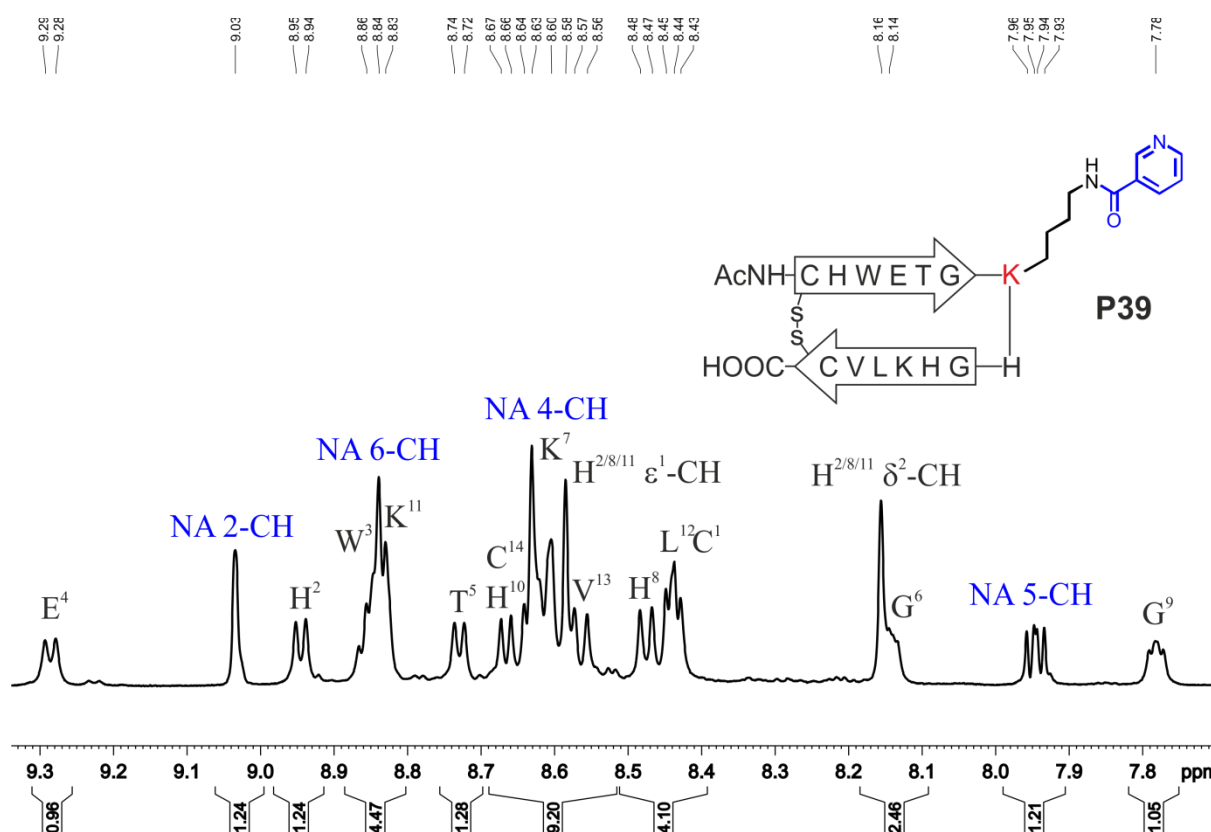
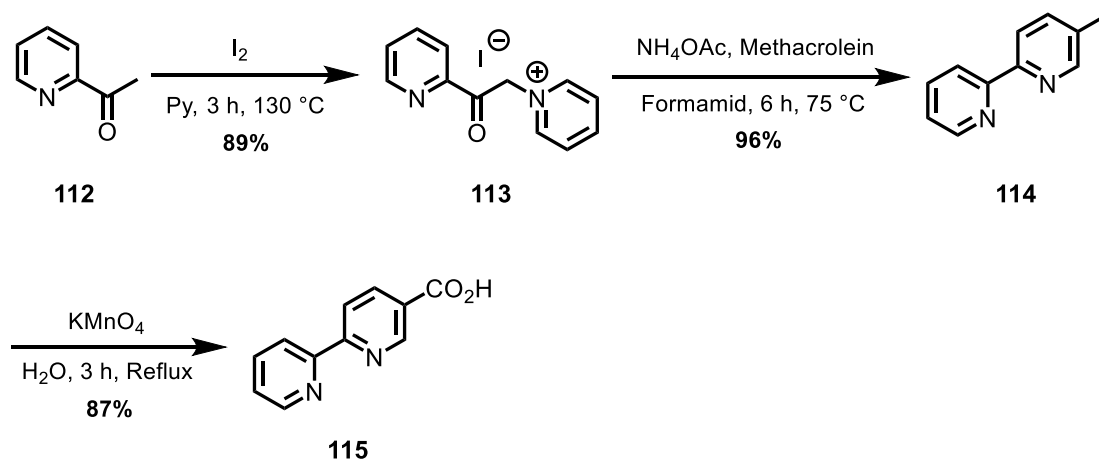


Abbildung 6-6: Amidbereich des ¹H-NMR Spektrums (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) von Peptid **39**, an welchem die Lys⁷ Seitenkette mit Nikotinsäure **111** modifiziert wurde. Die Modifikation der Seitenkette hat keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Peptids. Das Spinsystem der Nikotinsäure kann anhand des charakteristischen Musters im TOCSY-Spektrum identifiziert werden.

Da Nikotinsäure keine ausgeprägte Metal-chelatisierende Wirkung hat, wurde das Pyridin-Grundgerüst zum Biipyridin erweitert, um eine chelatisierende Einheit zu erhalten über deren Eigenschaften schon ausgiebig in der Fachliteratur berichtet wurde.^[304,305]

Die Synthese der [2-2'-Biipyridin]-5-Carbonsäure **115** erfolgte über drei Stufen ausgehend von 2-Acetylpyridin **112** und ist in Schema 6-26 gezeigt.^[38,306–308]



Schema 6-26: Synthese von [2,2']-5-Carbonsäure **115** ausgehend von 2-Acetylpyridin **112**: Enolisierung der Acetyl-CH₃-Gruppe mittels Iod in Pyridin lieferte das Pyridiniumsalz **113**, welches anschließend mit Ammoniumacetat in Formamid mit Methacrolein zu 5-Methyl-[2,2'-Bipyridin] **114** umgesetzt wird. Oxidation der exozyklischen Methylgruppe lieferte die Carbonsäure **115**.^[38,306]

Die Synthese des [2,2'-Bipyridin]-funktionalisierten Peptids **P40** erfolgte analog zu Schema 6-25. Das dazugehörige ¹H-NMR Spektrum ist in Abbildung 6-7 gezeigt.

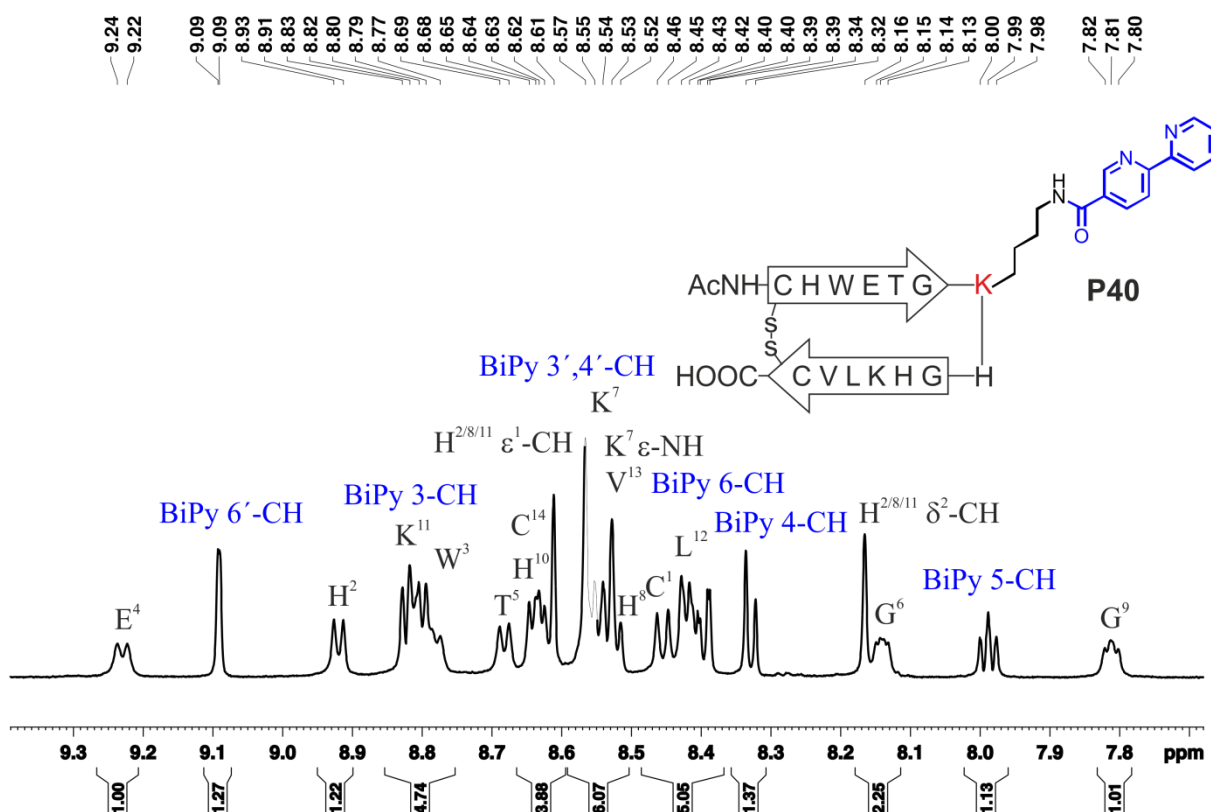
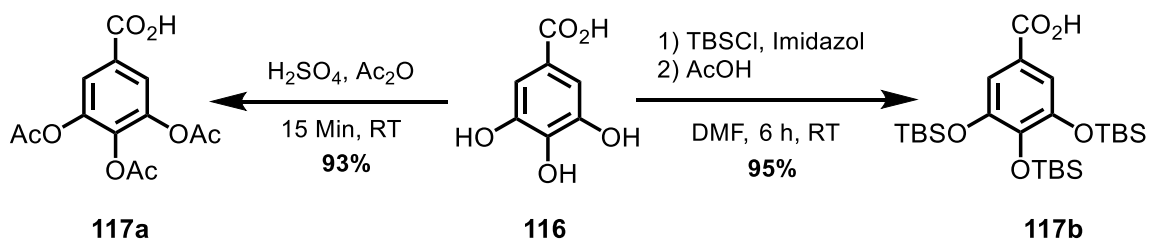


Abbildung 6-7: Amidbereich des ¹H-NMR Spektrums (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) von Peptid **P40**, an welchem die Lys⁷ Seitenkette mit [2,2']-Bipyridin **115** modifiziert wurde. Die Identifikation der Seitenketten-Modifikation erfolgte mittels TOCSY-Spektrum.

Als weitere Modifikation sollte Gallussäure an die Seitenkette von Lys⁷ gebracht werden. Aufgrund der bekannten Redoxaktivität von Gallol- und Catechol-Derivaten^[309–311] könnte eine Interaktion oder Reaktion über eine radikalische Zwischenstufe mit dem aktiven Zentrum der Hydroxylase stattfinden.^[312–315] Um die gleiche Synthesestrategie aus Schema 6-25 anwenden zu können, musste die Gallol-Funktion der Gallussäure **116** geschützt werden (Schema 6-27). Zunächst wurden Acetyl-Schutzgruppen **117a** verwendet. Das entsprechende Trisacetoxy-geschützte Derivat der Gallussäure konnte in einer einstufigen Synthese, ausgehend von Gallussäure **116** erhalten werden.^[316,317] Das Derivat **117a** konnte mit der in Schema 6-25 gezeigten Strategie erfolgreich in die Lys⁷ Seitenkette eingebracht werden. Da die Acetyl-Schutzgruppen jedoch nicht säurestabil sind, musste eine Verseifung an der Festphase, unmittelbar vor der Harzabspaltung stattfinden. Die Abspaltung wurde mit 1 M Natriummethanolat-Lösung in Methanol versucht, da diese Vorgehensweise bereits beschrieben wurde.^[318] Es konnte jedoch nach Disulfid-Oxidation und HPLC Aufreinigung keine Abspaltung der Schutzgruppen beobachtet werden, weshalb eine alternative Schutzgruppe, hier TBS, verwendet werden musste.^[319] Es wurde Verbindung **117b** an die Lys⁷ Seitenkette gekuppelt. Unmittelbar vor der Harzabspaltung wurden die TBS-Schutzgruppen mittels 1 M TBAF in THF abgespalten.^[320] Nach Disulfid-Oxidation und Aufreinigung konnte das Gallussäure-modifizierte Peptid **P41** erhalten werden.



Schema 6-27: Synthese der beiden geschützten Gallussäure **114a** und **114b**, welche in der Synthese entsprechend Schema 6-25 eingesetzt wurde.

Da es sich bei der Gallussäure um ein A₂-Spinsystem handelt, wird im ¹H-NMR Spektrum des modifizierten Peptids nur ein aromatisches Singulett erhalten. Dies konnte mittels HSQC-Spektrum bestätigt werden (Abbildung 6-8).

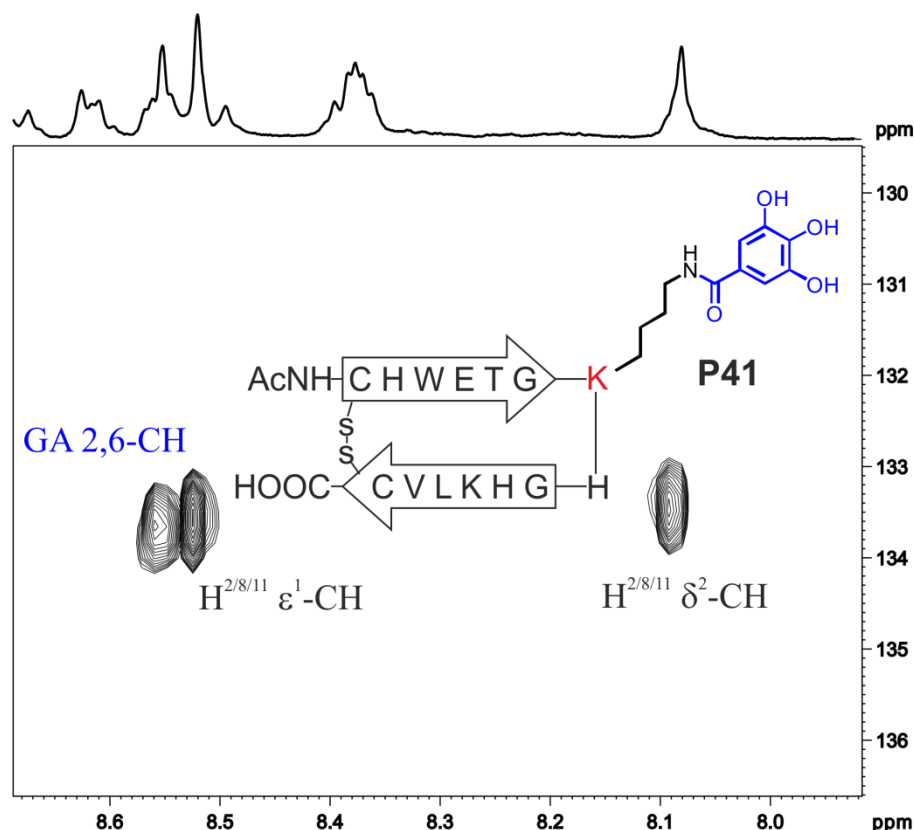
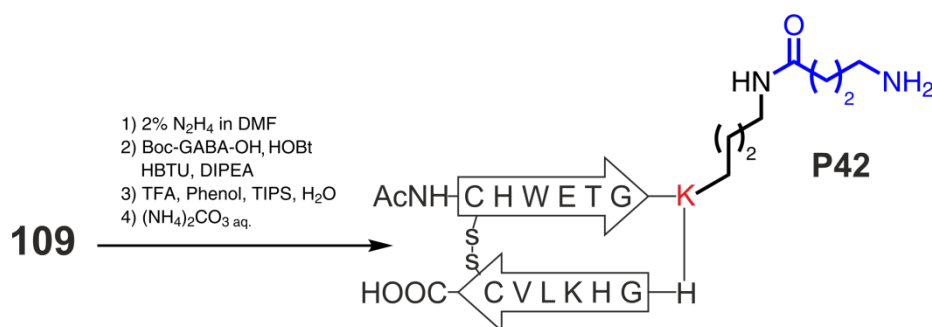


Abbildung 6-8: HSQC-Spektrum (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) von Gallussäure modifiziertem Peptid **P41**: Die CH-Signale der Gallussäure können trotz nahezu identischer Verschiebung in der ¹³C-Dimension durch den Unterschied im ¹H-Dimension identifiziert und von H^{2/8/11} ε-CH unterschieden werden.

Die Funktionalisierung der Lys⁷ Seitenkette mit Boc-geschützter γ-Aminobuttersäure lieferte das Peptid **P42**, bei der die Seitenkette der Hypusinierungsstelle ein Mimetikum des Desoxyhypusins darstellt. Lediglich die Anbindung des *n*-Butylamin Restes erfolgte dabei durch eine Amidbindung, was sich von dem natürlichen L-Desoxyhypusin unterscheidet (Schema 6-28).



Schema 6-28: Synthese des Desoxyhypusin-Mimetik Peptids **P42**: Durch Anbindung von Boc-geschützter γ-Aminobuttersäure an die Lys⁷ Seitenkette **109** wird das Peptid **P42** erhalten, bei welchem die Seitenkette des Lys⁷ dem natürlich vorkommenden L-Desoxyhypusin nachahmt.

Das dazugehörige ¹H-NMR-Spektrum von **P42** ist in Abbildung 6-9 gezeigt.

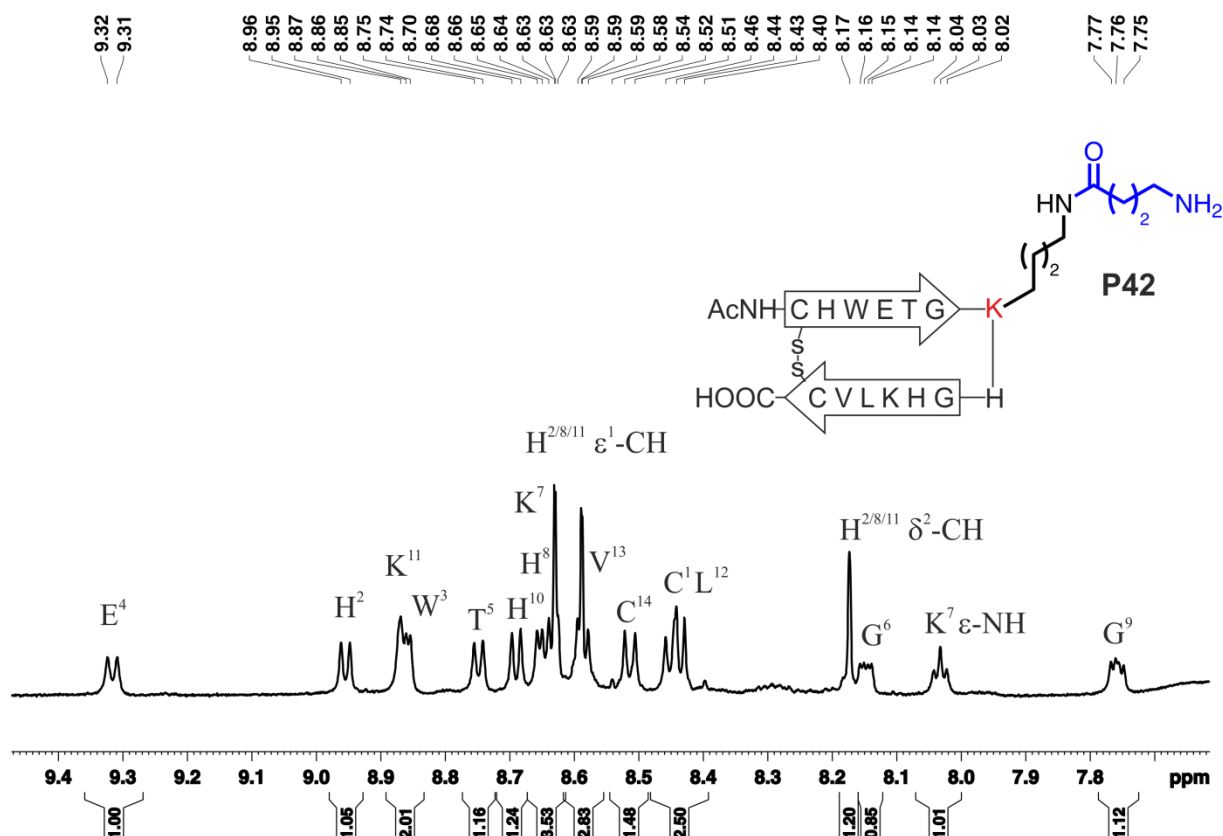


Abbildung 6-9: Amidbereich des ¹H-NMR Spektrums (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) von Peptid **P42**, an dem die Lys⁷ Seitenkette mit γ-Aminobuttersäure modifiziert wurde: Erneut ist erkennbar, dass die Modifikation der Seitenkette keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Peptids hat. Das ε-NH von Lys⁷ bei 8.03 ppm bestätigt die erfolgreiche Anbindung der γ-Aminobuttersäure.

Das entsprechende Spinsystem der aliphatischen Kette der γ-Aminobuttersäure kann im TOCSY-Spektrum identifiziert werden (Abbildung 6-10).

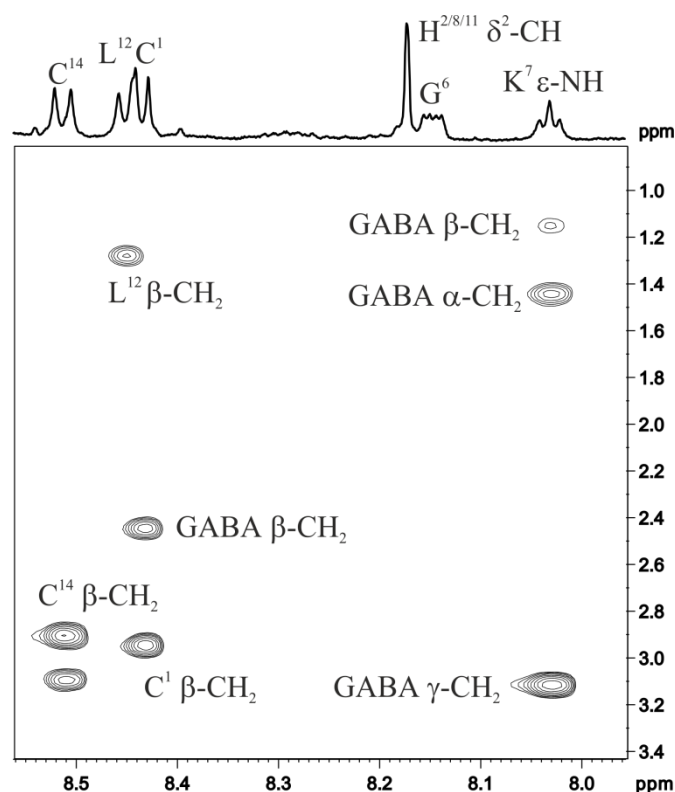
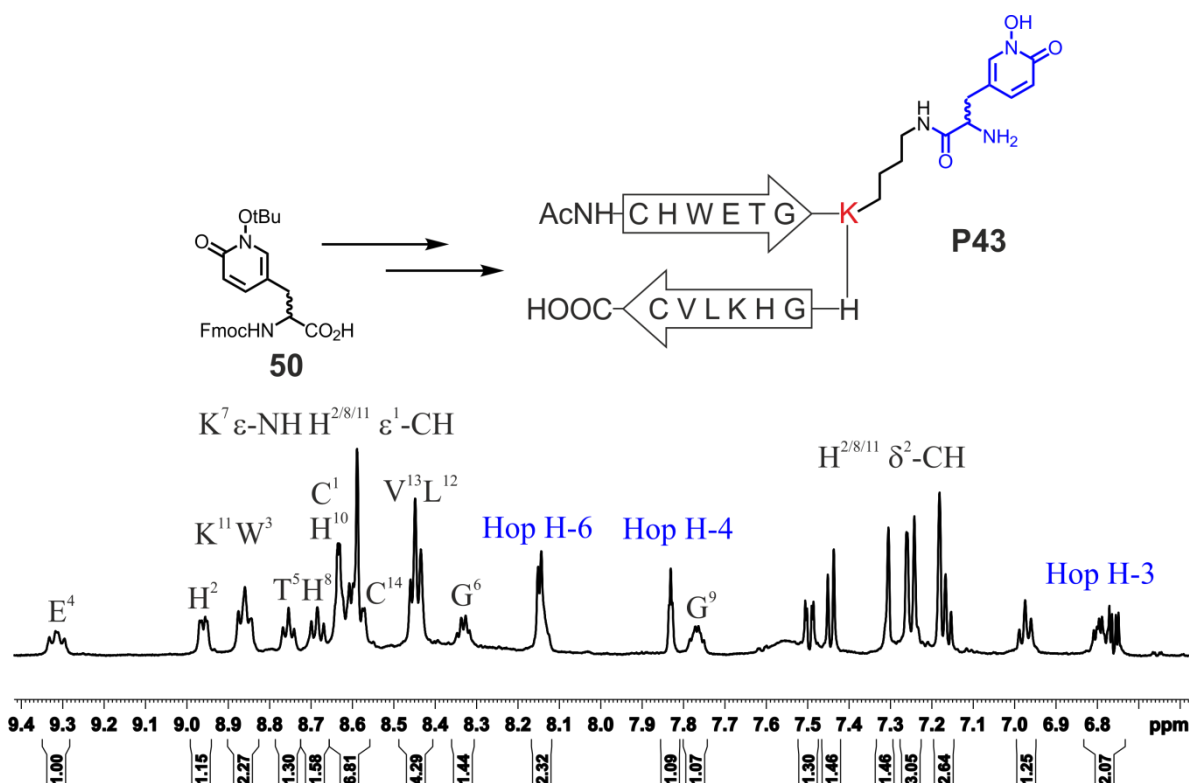


Abbildung 6-10: Ausschnitt des TOCSY-Spektrums (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) von Peptid **P42**: Es kann eindeutig, dass Spinsystem der γ -Aminobuttersäure, welche an die Seitenkette von Lys⁷ angebracht wurde, identifiziert werden.

Weitergehend wurde auch die Aminosäure L-Hop in die Seitenkette von Lys⁷ eingebracht, indem der Fmoc-Baustein **50** eingesetzt wurde. Nach dem Einbau der Aminosäure nach der in Schema 6-25 gezeigten Reaktionsabfolge, erfolgte eine erneute Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe, bevor das Peptid **P43** vom Harz abgespalten wurde. Da die *t*-Butyl-Schutzgruppe des Pyridons bei der Harzabspaltung nur zu ca. 30% abgespalten wurde (überprüft mittels ¹H-NMR Spektroskopie), erfolgte eine erneute Abspaltung der Schutzgruppe, indem das Peptid in 95% TFA gelöst und über Nacht gerührt wurde. Abschließende Disulfid-Oxidation und Aufreinigung lieferte das Peptid **P43** als Gemisch beider Diastereomere, da die Aminosäure **50** als Racemat eingesetzt wurde. Da die Modifikation der Lys⁷ Seitenkette keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Peptids hat, wurden auch keine unterschiedlichen Retentionszeiten bei der HPLC Aufreinigung erhalten, sodass beide Diastereomere unter den gegebenen Bedingungen nicht aufgereinigt werden konnten.



Schema 6-29: Synthese und das ¹H-NMR Spektrum (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0) des Peptids **P43**: Durch die Anwendung der racemischen Aminosäure **50** wird das Peptid **P43** als Gemisch beider Diastereomere erhalten. Dies resultiert darin, dass einige der amidischen Protonen als pseudo-Triplett erscheinen, da es sich dabei um die Überlagerung zweier Dubletts der Diastereomere handelt.

An den charakteristischen Signalen der Pyridon-Seitenkette kann die erfolgreiche Anbringung der Aminosäure an die Lys⁷ Seitenkette bestätigt werden.

Analog zu **P38** ändert die Seitenkettenmodifikation des Lysins nicht die Faltungspopulation der Peptide. Zu den Peptiden mit modifizierter Lys⁷-Seitenkette **P39-P43** liegen zum aktuellen Zeitpunkt noch keine biologischen Daten vor. Geplant sind hier diese Peptide in dem Enzymassay an der Hydroxylase zu testen.

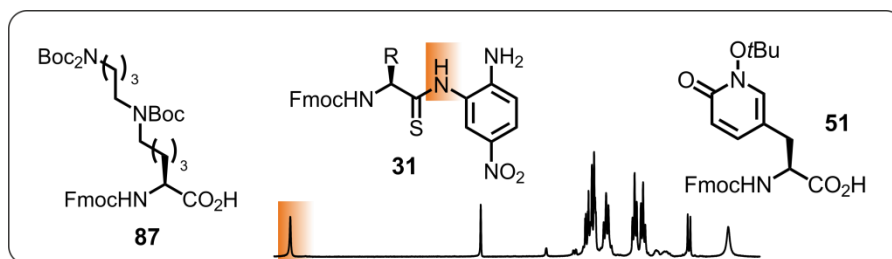
7. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Synthesen neuer, funktionaler Aminosäuren entwickelt, welche dann modular in Peptide des eIF5a-Proteins eingebracht wurden. Um diese Peptide in einer stabilen β -hairpin Konformation zu fixieren, wurde ein hydrophober Cluster aus acht Aminosäuren als stabilisierendes Netzwerk verwendet. Zur strukturellen Charakterisierung wurde NMR-Spektroskopie genutzt und es wurden Parameter diskutiert, anhand deren die Faltungspopulation eines β -hairpin Peptids quantifiziert werden kann. Neben der Synthese dieser funktionaler, SPPS-tauglicher Aminosäuren wie beispielsweise einem Desoxyhypusinderivat **87**, einem Thioamid-Aktivester **31** oder einer metallkomplexierenden Aminosäure **51** (Abbildung 7.1a) wurde untersucht, wie sich die jeweiligen modularen Modifikationen auf die Funktionalität des Biomakromoleküls auswirkt (Abbildung 7.1b). Dabei konnte gezeigt werden, dass das stabile Netzwerk der hydrophoben Wechselwirkungen in der Peptidstruktur sogar in der Lage ist aktive Eingriffe, wie beispielsweise den Einbau von *N*-methylierten- oder Thioamiden in dessen intramolekulares Netzwerk aus Wasserstoffbrücken zu kompensieren (Abbildung 7.1b grün). Besondere Bedeutung kommt dabei der Epitop-Sequenz GKHG der Peptide hinzu. Die *turn*-induzierenden Eigenschaften von KH wurden im Kontext natürlicher und synthetischer Dipeptidmimetika charakterisiert. Das doppelte Glycin-Motiv ist ein weiteres Alleinstellungsmerkmal dieses Proteins. Da diese Aminosäure jede mögliche Konformation im *Ramachandran-Plot* annehmen kann, konnte allein aus den Daten der GG-haltigen Peptide kein eindeutiges strukturelles Modell auf Basis der NMR-Daten entworfen werden. Hierzu wurden einzelne und paarweise Alanin-Mutation in den beiden Positionen durchgeführt (Abbildung 7.1b orange), so dass auf Basis der NMR-Daten dieser Mutationen anschließend ein dreidimensionales Bild des *hairpins* entworfen werden konnte (Abbildung 7.1c). Bei Studien zur Fragestellung wie groß das Epitop maximal sein darf, so dass noch eine stabile Struktur erhalten wird (Abbildung 7.1b beige), konnte gezeigt werden, dass bei Erhöhung der AS-Anzahl das Einbringen einer weiteren intramolekularen Disulfid-Brücke die Struktur maßgeblich stabilisiert. Im Kontext der *hairpin*-Periodizität konnte das Konzept dabei bis auf eine Gesamtanzahl von 22 Aminosäuren angewendet werden. Hierdurch konnte weiterführend gezeigt werden, dass beim Einbau einer ungeraden Anzahl an Cysteinen es zur gewünschten, regioselektiven, intramolekularen Disulfid-Oxidation entsprechend der *hairpin*-Periodizität kommt (Abbildung 7.1b lila). Die Anwesenheit einer reduzierten Cystein-Seitenkette konnte mittels HSQC-Spektrum, als auch über eine

Maleimid-Thioether-Ligation nachgewiesen werden. Diese Strategie könnte ferner zur Ligationsmethode genutzt werden, um supramolekulare Aggregate in wässriger Umgebung darzustellen.

Eine weitere, neuartige Ligationsmethode konnte gefunden werden, indem die metallbindende Aminosäure **50** in der Peptidsynthese angewandt wurde. Zwar reduzierte diese Aminosäure im Peptidrückgrat die Faltungspopulation des Peptids, jedoch konnte durch die Zugabe von Ga^{3+} ein trimerer Peptidkomplex erhalten werden, der eine signifikant höhere Faltungspopulation aufwies (Abbildung 7.1c). Durch Zugabe eines kompetitiven Metallchelators konnte die Reversibilität des Prozesses nachgewiesen werden. Auch diese Ligationsmethode ist ferner im wässrigen System in der supramolekularen Chemie anwendbar.

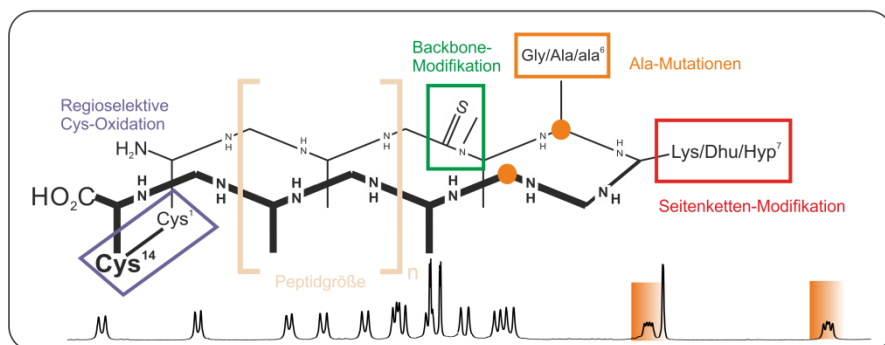
Im Rahmen von biologischen Studien mittels konfokaler Mikroskopie und Durchflusszytometrie (Abbildung 7-1d) konnte gezeigt werden, dass die dargestellten Peptide im Jurkat 2D10-Zellsystem eine spezifische Reaktion an der Zellmembran auslösen, was auf die Existenz eines bisher noch nicht eindeutig nachgewiesenen eif5a-sensitiven Rezeptors vermuten lässt. Eine apoptotische Wirkung konnte nicht gefunden werden. In Durchflusszytometrie-Experimenten an mononukleären Zellen des peripheren Blutes konnte nachgewiesen werden, dass die Peptide eine hohe Affinität gegenüber Monozyten aufweisen, die selbst die Messintensität moderner Durchflusszytometer übersteigt. Diese Beobachtung könnte zukünftig dazu genutzt werden, selektiv Wirkstoffe zu den Monozyten zu transportieren, welche mittels reversibler Chemie an das Peptid konjugiert werden (Abbildung 7.1c). Das ist für die Entwicklung von medizinischen Wirkstoffen von großer Bedeutung, da einige Bakterien und auch Viren in den Monozyten hosten, um der Immunantwort zu entgehen und somit schwierig zu adressieren sind.



1. Synthese neuer, funktionaler Aminosäuren

2. Anwendung in der SPPS

A Entwicklung der Synthese von geschützten Aminosäuren, die unmittelbar in der automatisierten Peptidsynthese modular eingesetzt werden können.

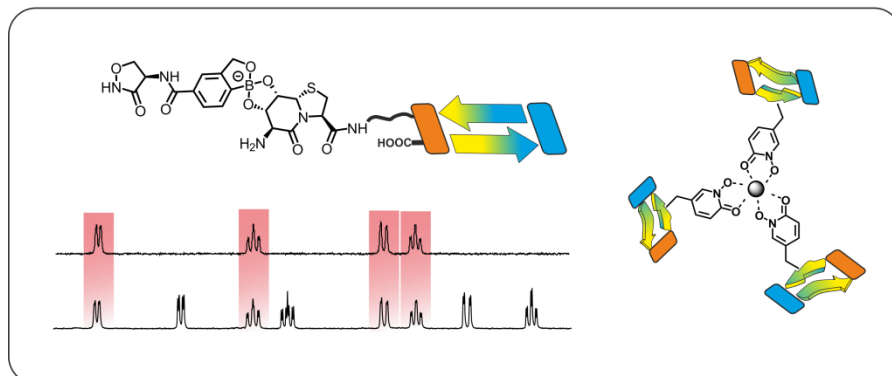


3. Entwicklung modularer Mutationen

4. Abspaltung der Peptide vom Harz

5. Regioselective Cys-Oxidation

B Synthese von Hybridepitopen durch modulare Mutatione zum Verständnis von Struktur und Dynamik der Epitop-Region.



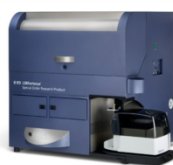
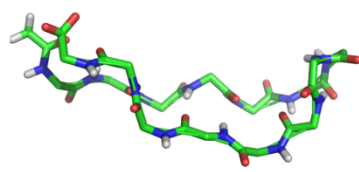
6. NMR-Spektroskopie

7. Sequential walk

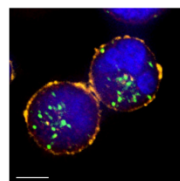
8. Molekulare Funktionalität

9. Strukturvorschlag

C NMR-Spektroskopie zur Bestimmung von Konstitution, Konformation und Funktion.



Durchflusszytometrie



Mikroskopie

10. Biologische Evaluation

D. Anwendung in konfokaler Mikroskopie & Durchflusszytometrie, Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Abbildung 7-1: Von der funktionalen Aminosäure zur funktionalen Einheit: Durch den Einbau neuer, funktionaler Aminosäure in das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte *hairpin*-Peptid können nach struktureller Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie funktionelle Peptide erhalten werden, deren Effekt mittels Durchflusszytometrie und Mikroskopie sichtbar gemacht werden können.

8. Summary and Outlook

Within the scope of this work new synthetic procedures towards unique functional amino acid derivatives were developed. These amino acids were then used to build up peptides of the eif5a-protein. A hydrophobic cluster containing eight amino acids was used to rigidify these peptides in a fixed β -hairpin conformation in solution. Structural analyses were performed by modern 2D NMR techniques and parameters for the quantification of the folded fraction were discussed. Besides the syntheses of a desoxy hypusine derivative **87**, activated thio amide esters **31** and a metal complexing amino acid **51** (figure 7.1a) it was studied how these modular modifications have an impact on the functionality of these biomacromolecules (figure 7.2b). It was proven that the strong hydrophobic interactions are able to even compensate changes in its network of hydrogen bonding by the incorporation of *N*-methylated amides or thio amides (figure 7.1b green). The unique GKHG epitope motif is only found in the eif5a-protein. Due to the double presence of Gly residues within the turn region, structural analyses were not able to provide a clear proposed three-dimensional peptide structure. Therefore single and double Ala mutations were performed (figure 7.1b orange), so that on the basis of these NMR data it was possible to determine a plausible structure of the peptide. In studies, where the size of the peptide in the context of the hydrophobic cluster (figure 7.1 beige) was studied, it was shown the concept can be adapted to peptides up to 22 amino acid residues. By the usage of five cysteine residues the hairpin still oxidized in a regioselective, intramolecular fashion according to the periodicity of a β -hairpin. The presence of a free thiol group within this large peptide was verified via HSQC spectra and Maleimid-thioether ligation reactions. This strategy could further be used to create supramolecular aggregates in aqueous media.

A new ligating method was found by the usage of the amino acid building block **51** in peptide syntheses. The incorporation of these functional amino acids reduced the folded fraction, but upon the addition of Ga^{3+} a trimeric peptide-metal-complex (figure 7.1c) was obtained, which showed a significantly higher folded fraction. By the addition of a strong competitive metal chelator the reversibility of this process was confirmed.

Within biological studies these peptides were used in confocal microscopy as well flow cytometry (figure 7.1d) where the peptides induced a specific reaction within the cell membrane of Jurkat 2D10 HIV-cells, which confirms the consumption of an eif5a-selective cell receptor. An apoptotic behaviour was not obtained. Within peripheral blood mononuclear cells the peptides showed such a high affinity towards monocytes, which scales off the limit of modern flow cytometers. This observance could further be used to selectively transport drugs conjugated to the peptide to monocytes for the development of new medical treatments.

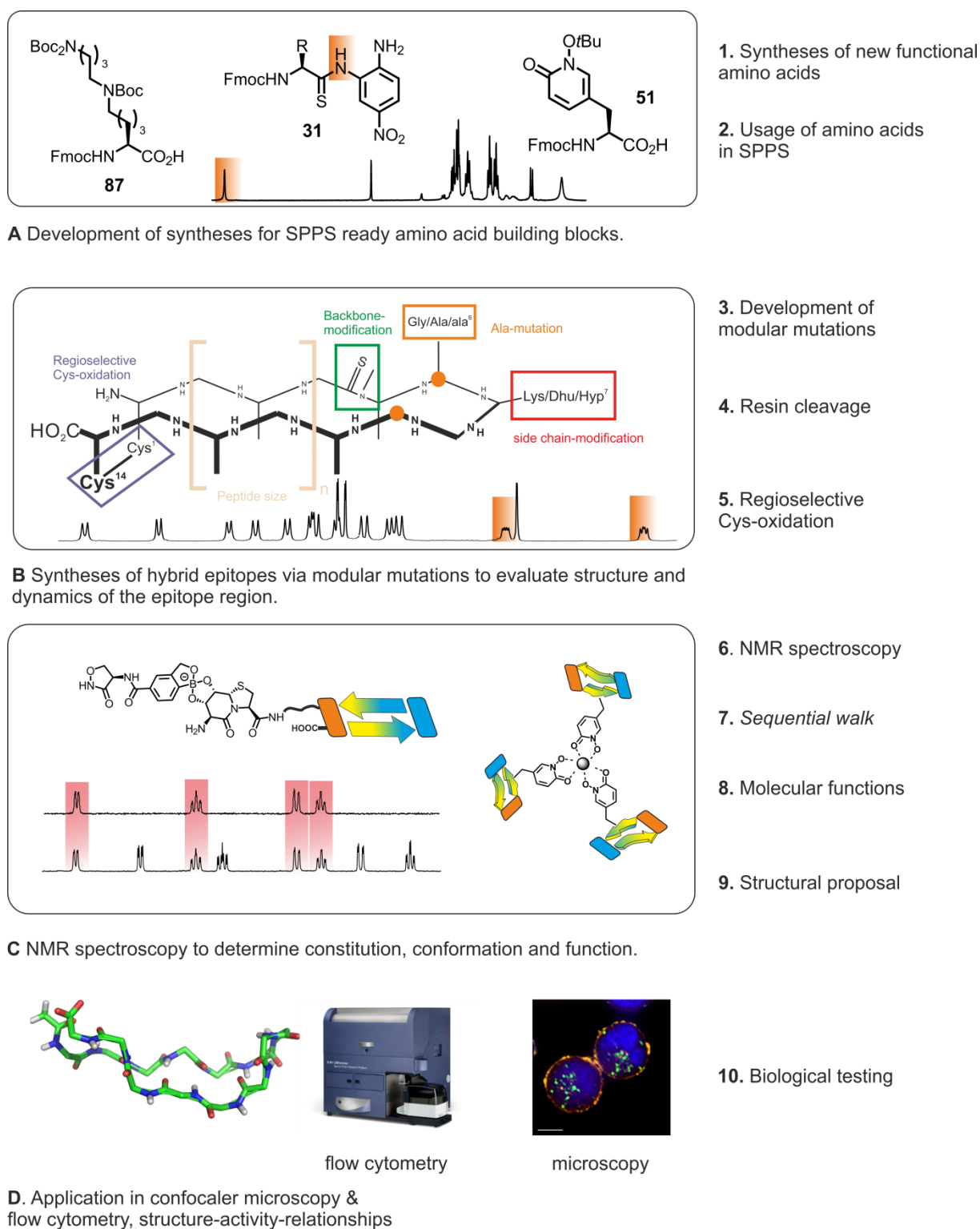


figure 7-2: From a functional amino acid to a functional unit: By using new functional amino acid building blocks in SPPS within the β -hairpin peptide structures, which were developed in the scope of this work, peptides with novel functionalities are obtained. Structural analyses were performed by NMR spectroscopy, while biological testing included the usage of confocal microscopy and flow cytometry.

9. Experimenteller Teil

9.1 Allgemeine Hinweise

Lösungsmittel und Reagenzien

Alle verwendeten organischen Lösungsmittel wurden vor Verwendung destillativ gereinigt. Absolutierte Lösungsmittel wurden mit durch die etablierten Methoden getrocknet und über Molsieb (3 Å) gelagert. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Reagenzien wurden von den Herstellern *Sigma-Aldrich*, *Alfa Aesar*, *Roth Chemikalien*, *Bachem*, *Merck* oder *Tokyo Industry Chemicals* bezogen. Aminosäuren für die Peptidsynthese wurden von *Iris Biotech* erworben. DMF, Piperidin in DIPEA wurden im Reinheitsgrad „*peptide grade*“ verwendet. MeCN für HPLC-Anwendungen wurde im Reinheitsgrad „*HPLC grade*“ angewandt. Reinstwasser für die HPLC wurde mit einem *Thermo Scientific Barnstead Micropure* Aufreinigungssystem erhalten.

Alle Reaktionen mit luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden unter Schutzgasatmosphäre (Argon oder Stickstoff) durchgeführt.

Dünnschichtchromatographie

Aluminium-DC-Platten Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma *Merck* wurden verwendet. Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenzauslöschung mit einer UV-Lampe bei 254 nm oder durch Verwendung eines der folgenden Färbereagenzien:

Ninhydrin-Lösung:	350 mg Ninhydrin, 100 mL <i>n</i> -Butanol, 4 mL Eisessig
Mostain-Lösung:	20 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4 H ₂ O, 0.4 g Ce(SO ₄) ₂ , 400 mL 10% H ₂ SO ₄ aq.
KMnO ₄ -Lösung:	20 g K ₂ CO ₃ , 3.0 g KMnO ₄ , 300 mL H ₂ O, 5.0 mL 10% NaOH _{aq} .
Anisaldehyd-Lösung:	10 mL <i>p</i> -Anisaldehyd, 10 mL H ₂ SO _{4, konz.} , 200 mL EtOH
Vanillin-Lösung:	6.0 g Vanillin, 1.5 mL 10 mL H ₂ SO _{4, konz.} , 95 mL EtOH

Flashchromatographie

Als stationäre Phase der Flashchromatographie wurde Kieselgel 60 M (Korngröße 0.040-0.063 mm, 230-400 *mesh*) der Firma Merck verwendet. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung eines Pressluft-Überdrucks.

NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Spektren dieser Arbeit wurden an folgenden Geräten aufgezeichnet:

Bruker AV II 300 für ^1H (300.13 MHz) und ^{13}C (75.4 MHz) Routinemessungen.

Bruker DRX 400 für ^1H (399.95 MHz), ^{13}C (100.57 MHz), sowie 2D-Spektren in organischen Lösungsmitteln.

Bruker DRX 500 und *Bruker AV III HD 500* für ^1H (399.95 MHz), ^{13}C (100.57 MHz), sowie 2D-Spektren in organischen Lösungsmitteln.

Bruker AV II 600 für ^1H (600.13 MHz) und 2D-Spektren in organischen Lösungsmitteln oder wässrigen Puffersystemen mit *Watergate*-Pulssequenz zur Wasserunterdrückung.

Routinemessungen erfolgten durch einen automatisierten Probenwechsel. Die Aufnahme den Spektrometern *DRX-400*, *DRX-500*, *AV III 500* und *AV III 500* erfolgte ausschließlich durch die Mitarbeiter der NMR-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg. Messungen am *AV II 600* wurden selbstständig durchgeführt.

Kalibrierung der NMR-Spektren von organischen Lösungsmitteln erfolgte auf die Resonanzsignale des jeweiligen Restprotonensignals (DMSO- d_6 : ^1H : 2.50 ppm, ^{13}C : 39.5 ppm; CDCl_3 : ^1H : 7.26 ppm, ^{13}C : 77.1 ppm). Bei Messungen in wässrigen Puffersystemen wurde 3-(Trimethylsilyl)-2,2,3,3-Propansäure- d_4 Natriumsalz (TSP- d_4) als interner Standard verwendet (^1H : 0.00 ppm). Die chemische Verschiebung δ ist in *parts per million* (ppm) angegeben und wurde aus der Mitte des Kopplungsmusters abgelesen. Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) angegeben.

Die angegebenen Multiplizitäten sind phänomenologisch. Signale von diastereotopen Protonenpaaren, deren keine eindeutige Stereochemie zugewiesen werden kann, wurden mit den Indices *h* und *t* für das jeweilige hochfeldige bzw. tieffeldige Proton gekennzeichnet. Nicht eindeutig zugeordnete aromatische Signale sind mit „*arom.*“ bezeichnet.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden durch die Mitarbeiter der massenspektrometrischen Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg aufgezeichnet. Messungen erfolgten an einem *Finnigan LTQ-FT* Massenspektrometer der Firma *Thermo Fischer Scientific*. Als Ionisationsmethode wurde die Elektrospray-Ionisations-Methode (ESI) verwendet. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse und entspricht jeweils den Massen der Isotope gemäß ihrer größten natürlichen Häufigkeit. Die massenspektrometrische Analyse sämtlicher Peptide erfolgte durch Kopplung an ein HPLC-System (*Agilent 1100 Series*).

UV/Vis-Spektroskopie

Messungen zur Bestimmung der Harzbeladung von Fmoc-geschützten Aminosäuren an 2-CTC-Harz wurden an einem *Thermo Fisher Scientific Multiskan Go* in Polyethylen-Einfachküvetten ($d = 1\text{ cm}$) durchgeführt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Die analytischen HPLC-Chromatogramme wurden an einem *Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000* System bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgenommen. Dieses besteht aus einer *LPG-3400SD* Pumpe, einem *WPS-3000SL* Probennehmer, einem *TCC-3000SD* Säulenofen und einem *DAD-3000* Detektor. Als stationäre Phase wurde eine *ACE UltraCore 2.5 SuperC18* Säule ($150 \times 2,1\text{ mm}$, $2,5\text{ }\mu\text{m}$, $95\text{ }\text{\AA}$) verwendet. Als Fließmittel wurden folgende Eluenten bei einer Flussrate von $0,45\text{ mL/min}$ genutzt: A: $\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ TFA, B: $\text{ACN} + 0,085\%$ TFA. Die angegebenen Retentionszeiten t_r entsprechen den absoluten Retentionszeiten, da kein Totzeitmarker verwendet wurde.

Für semi-präparative Anwendungen wurde ein *Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000* semi-präparatives System, bestehend aus einer *HPG-3200BX* Pumpe, einem *ERC Series-300* Lösungsmittelentgaser, einem *MWD-3000* Detektor und einem *AFC-3000* Fraktionskollektor, genutzt. Als stationäre Phase wurde entweder eine *Macherey-Nagel VP Nucleodur C18 Gravity* Säule ($125 \times 21\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$, $110\text{ }\text{\AA}$) bei einer Flussrate von 15 mL/min , oder eine *ACE 5 SuperC18 Säule* ($150 \times 10\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$, $90\text{ }\text{\AA}$) mit einem Fluss von $7,0\text{ mL/min}$ verwendet. Als Eluenten wurden dieselben Fließmittel wie bei dem analytischen HPLC-System genutzt. Nach der Aufreinigung wurden die Verbindungen an einer Gefriertrocknungsanlage des Typs *Alpha 2-4 LD plus* der Firma *Christ* gefriergetrocknet.

9.2 Allgemeine Hinweise zur automatisierten Peptidsynthese

Falls nicht anders angegeben, wurden Peptidsynthesen mittels Fmoc-Schutzgruppen-Strategie in DMF mit 2-CTC-Harz (200-400 *mesh*, 1% Divinylbenzol, Kapazität 1.63 mmol/g) im 0.1 mmol Maßstab durchgeführt.

Beladung des Harzes

Die zu beladene Menge Harz wurde in einer Glasfritte unter Durchmischung durch einen Gasstrom bei Raumtemperatur für 30 Minuten gequellt. Das Lösungsmittel wurde anschließend abfiltriert und das Harz wurde mit 2.0 eq der entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäure und 5.0 eq DIPEA versetzt. Die Suspension wurde für eine Stunde durchmischt (Ausnahme: Fmoc-Cys(Trt)-OH für drei Stunden). Nach Waschen mit DMF wurde das Harz zweifach für je 30 Minuten mit einem Gemisch aus DCM/MeOH/DIPEA (80:15:5) versetzt, um verbliebene Reaktivpositionen zu blockieren. Nach Waschen mit DMF, DCM und MeOH wurde das Harz *in vacuo* getrocknet. Mittels UV/Vis-Spektroskopie wurde die Harzbeladung abgeschätzt. Hierzu wurde eine bestimmte Menge Harz (ca. 2 mg) abgewogen und mit 1 mL 20% Piperidin-Lösung in DMF versetzt. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wurde die Suspension mit 5 mL MeOH verdünnt und die Absorption des entstandenen Fluorens wurde bei 289 nm und 301 nm gemessen. Anschließend wurde die Beladung des Harzes gemäß dem *Lambert-Beerschen-Gesetz* berechnet.

Automatisierte Peptidsynthese

Peptidsynthesen wurden an einem mikrowellenunterstütztem Peptidsynthesizer *LibertyBlue* der Firma *CEM* durchgeführt. Das Harz wurde manuell für zehn Minuten bei Raumtemperatur in DMF vorgequellt. Dabei wurde folgendes Protokoll verwendet:

Fmoc-Abspaltung:	T = 50 °C (30 W), 3 min, 20% Piperidin in DMF (0.1% HOBt)
Aminosäure-Kupplung:	T = 50 °C (30 W), 10 min, je 5.0 eq AS, DIC, Oxyma
	für Fmoc-Arg(Pbf)-OH: T = 25 °C, 25 min, T = 50 °C (30 W), 11 min, je 5.0 eq AS, DIC, Oxyma
Waschen:	Je dreifach mit DMF nach Fmoc-Abspaltung

Abspaltung des Peptids vom Harz

Das synthetisierte Peptid wurde mit einer Lösung aus TFA/H₂O/Phenol/TIPS (88:5:5:2) für drei Stunden bei Raumtemperatur abgespalten. Nach Filtration wurde das Harz erneut mit wenig Abspalllösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck auf ca. 1 mL eingengt und der erhaltene Rückstand wurde in kalten DEE getropft. Die resultierende Suspension wurde zentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Der erhaltene Rückstand wurde zweifach mit kaltem DEE gewaschen. Danach wurde der Rückstand *in vacuo* getrocknet, in wenig H₂O/MeCN gelöst und an einer Gefriertrocknungsanlage (*Alpha 2-4 LD Plus* der Firma *Christ*) getrocknet.

Oxidative Zyklisierung von Cystein-haltigen Peptiden

Zur Bildung von intramolekularen Disulfide Cystein-haltiger Peptide wurde das entsprechende Rohpeptid in (NH₄)₂CO₃-Puffer (100 mM, pH 8.9) gelöst, sodass die Peptidkonzentration ca. 0.5 mM betrug. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für mehrere Tage im offenen Kolben gerührt. Der Umsatz der Reaktion wurde mittels analytischer HPLC verfolgt. Unlösliche Rückstände wurden mittels Zentrifugation abgetrennt und die Lösung wurde gefriergetrocknet. Das erhaltene Rohpeptid wurde anschließend durch semipräparative HPLC aufgereinigt.

.

9.3 Durchflusszytometrie und Mikroskopie

Alle Experimente an Jurkat-Zelllinien wurden eigenständig in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jonathan Karn am *Center for Aids Research, Department of Molecular Biology and Microbiology* der *Case Western Reserve University* in Cleveland, Ohio, USA durchgeführt.

Allgemeine Hinweise und Arbeitsmedium

Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Das nachfolgend als Arbeitsmedium bezeichnete Zellmedium bestand aus:

Je 25 mM HEPES und L-Glutamin in *Roswell Park Memorial Institute medium 1640* mit insgesamt 5% fetalem Kälberserum (Hitze inaktiviert) und Normicin in 1:500 Verdünnung (aus 50 mg/mL Stammlösung).

Jurkat E6 und 2D10-Zelllinien wurden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Mittels *cell counter* wurde die Zelldichte bestimmt. Zellviabilität wurde durch Anfärben mit Propidiumiodid (1:20 Verdünnung) abgeschätzt.

Die Zellen wurden so behandelt, dass sie eine Zelldichte von ca. 10⁷/mL nicht überstiegen. Dazu wurde zunächst die Zelldichte bestimmt. Lag diese über dem Grenzwert, so wurden die Zellen zentrifugiert, die überstehende Lösung entfernt und die Zellen wurden im doppelten Volumen von frischem Medium redispergiert.

Behandlung der Zellen mit Substanzen

Von allen zu untersuchenden Substanzen wurden 1 mM und 100 µM Stammlösungen angesetzt, aus denen die weiteren Konzentrationen durch Verdünnen erhalten wurden. Alle Experimente wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µL in 96 bzw. 384 *well plates* in Triplikaten durchgeführt. Dabei wurden immer E6, 2D10 ohne Stimulation und 2D10-Zellen mit TNF-α-Stimulation nebeneinander vermessen. Als Zelldichte wurde auf eine absolute Zellzahl von ca. 30000 Zellen/*well* abgezielt. 100 µL Arbeitsmedium wurden vorgelegt und mit dem Volumen der Zell-Stammlösung entsprechend ihrer zuvor bestimmten Dichte versetzt. TNF-α-Stimulation erfolgte in einer 1:1000 Verdünnung. Das Pipettieren wurde mit einem Pipettier-Roboter *Andrew1000G* der *AndrewAlliances* durchgeführt. Die Proben wurden für den entsprechenden Zeitraum inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Wurden fluoreszente Substanzen vermessen, so wurden die Zellen vor der Analyse je zweifach zentrifugiert und mit 100 µL *RoboSep Buffer* gewaschen, um extrazelluläre Substanzen zu entfernen.

Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie Analysen der Zellen wurden an einem *FACS MultiColor LSR-Fortessa* Zytometer der Firma *BD Biosciences* mit automatisiertem *Plate Reader* durchgeführt. Zur Datenaquisition wurde *FACSDiva Software* von *BD Biosciences* verwendet. Dabei wurde pro Experiment eine totale Zellzahl von 10000 vermessen. Folgende Messparameter wurden verwendet: *Sample flow rate* 2 µL/s, *sample volume* 50 µL, *mixing volume* 50 µL, *no. of mixes* 2, *wash volume* 500 µL, *BLR period* 5. Analysen erfolgten mit *WinList 3D Software* und *Flowing Software 2*, *University of Turku*, Finnland.

Konfokale Mikroskopie

Zur konfokalen Mikroskopie mit fluoreszenz-markierten Peptiden wurden Konzentrationspunkte entsprechend zu den zuvor durchgeführten Aufnahmestudien in der Durchflusszytometrie gewählt. Die Behandlung erfolgte wie zuvor beschrieben, wobei eine Zelldichte von 0.2 Mio/mL angezielt wurde. Alle Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit *Prof. Dr. David McDonald* am *Deltavision Core imaging system* am *Department of Molecular biology and Microbiology* der *Case Western Reserve University* in Cleveland, Ohio, USA durchgeführt. Alle gezeigten Aufnahmen sind einzelne Aufnahmen aus der z-Ebene, welche auf ihr Fluoreszenzsignal normalisiert wurden. Folgende Antikörper wurden verwendet:

- RAB7: Primär: Anti-[Rab7-117], Maus, IgG2b, 16 µg/mL (*AbCam* 50533).
 Sekundär: *Alexa Fluor 647 AffiniPure Fab Fragment Donkey*, Esel, IgG (H+L), 3 µg/mL (*Jackson ImmunoResearch* 711-607-003).
- RhoB: Anti-RhoB (Cy5), Kaninchen, IgG₁, 200 µg/mL, 1:250 Verdünnung (*SantaCruz Biotechnologies* sc-8048).

Optische Mikroskopie

Breitfeld-beleuchtete Aufnahmen zur Visualisierung von GFP-Expression wurden an einem *Nikon TE2000 inverted scope* mit einer *DS-QiMc Kamera* aufgezeichnet. Zur Aufzeichnung wurde *Nikon NIS Image Software* verwendet. Die Prozessierung der Aufnahmen erfolgte mit *ImageJ, NIH*.

9.4 Durchflusszytometrie an PBMCs

Die gezeigten Experimente wurden von *Dr. Hartmut Hanauske-Abel* und *Dr. Sukwinder Singh* an der *Rutgers University*, Newark, New Jersey, USA durchgeführt. Die nachfolgenden Angaben entsprechen einem von Dr. Hanauske-Abel zur Verfügung gestellten Protokoll.

1. Isolation von frischem, venösem Blut
2. Herstellen der Stammlösungen
3. Inkubation der Batches mit 200.000 Zellen in 2 mL RPMI-1640, 10% FBS
4. Kontrollanalyse der Proben mit mindestens 10.000 Zellen
5. Anfärben mit entsprechenden Antikörpern
6. Analyse mittels Durchflusszytometrie

Folgende Antikörper wurden verwendet.

T-Zellen: PE CD3; Maus IgG2 α κ. (*Biolegend* CD3-PE, Catalog 300308).

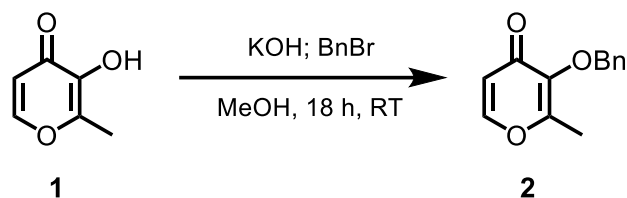
B-Zellen: APC CD19, Maus IgG1κ. (*Biolegend* CD19-APC, Catalog 302212).

Monozyten/Makrophagen: APC/FireTM 750 CD14, Maus IgG1κ. (*Biolegend* PerCP/Cy5.5 Annexin V, Catalog 640936).

9.5 Synthesen in Lösung

9.5.1 Synthese der Deferipron-Derivate

9.5.1.1 Synthese von Benzyl-Maltol



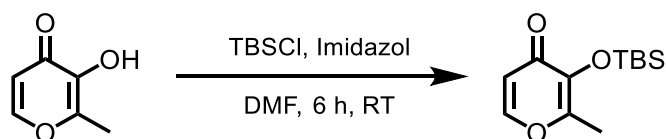
3.00 g (23.8 mmol, 1.0 eq) Maltol **1** wurden in 56 mL Methanol gelöst und unter Rühren wurden 2.00 g (35.7 mmol, 1.1 eq) KOH hinzugefügt. Nachdem eine homogene Lösung entstanden war, wurden 4.20 mL (6.10 g, 35.7 mmol, 1.1 eq) Benzylbromid hinzugefügt und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der erhaltene Rückstand wurde in 100 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und vierfach mit je 130 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Pentan:EtOAc 4:5, $R_f = 0.40$). Es wurden 4.98 g (23.0 mmol, 97%) Benzyl-Maltol **2** als gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO-d_6): $\delta = 8.03$ (d, 1H, $^3J = 5.7$ Hz, 6-CH), 7.42-7.31 (m, 5H, Ph), 6.36 (d, 1H, $^3J = 5.6$ Hz, 5-CH), 5.02 (s, 2H, Ph- CH_2), 2.11 (s, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO-d_6): $\delta = 173.8$ (C-4), 159.1 (C-2), 154.9 (C-6), 143.1 (C-3), 136.8 ($\text{C}_{\text{q, Ph}}$), 128.5 (CH_{Ph}), 128.2 (CH_{Ph}), 128.1 (CH_{Ph}), 116.4 (C-5), 72.6 (Ph- CH_2), 14.4 (CH_3) ppm.

HRMS: (ESI^+ , MeOH) für $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{Na}^+$ (MNa^+) ber.: 239.0679; gef.: 239.0713.

9.5.1.2 Synthese von TBS-Maltol



2.50 g (19.8 mmol, 1.0 eq) Maltol und 3.29 g (21.8 mmol, 1.1 eq) *Tert*-butyldimethylsilylchlorid wurden in 50 mL *N,N*-Dimethylformamid vorgelegt. Eine Lösung aus 2.70 g (39.6 mmol, 2.0 eq) Imidazol in 12 mL *N,N*-Dimethylformamid wurde hinzuge tropft und die Lösung wurde für sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit 50 mL 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung verdünnt. Die wässrige Phase wurde vierfach mit je 130 mL *n*-Pentan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde *in vacuo* getrocknet. Es wurden 4.31 g (17.9 mmol, 81%) als farbloser Feststoff erhalten.

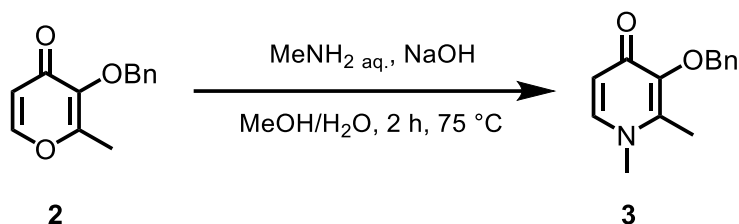
¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 8.02 (d, 1H, ³*J* = 5.7 Hz, 6-CH), 6.32 (d, 1H, ³*J* = 5.6 Hz, 5-CH), 2.11 (s, 3H, CH₃), 0.93 (s, 9H, (CH₃)₃), 0.18 (s, 6H, (CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 173.1 (C-4), 154.4 (C-6), 154.3 (C-3), 141.2 (C-2), 114.8 (C-5), 25.8 ((CH₃)₃), 18.3 (C_{q, tBu}), 14.5 (CH₃), 3.80 ((CH₃)₂) ppm.

²⁹Si-NMR (99 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 23.4 ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₂H₂₁O₃Si⁺ (MH⁺) ber.: 241.1255; gef.: 241.1254.

9.5.1.3 Synthese von Benzyl- Deferipron



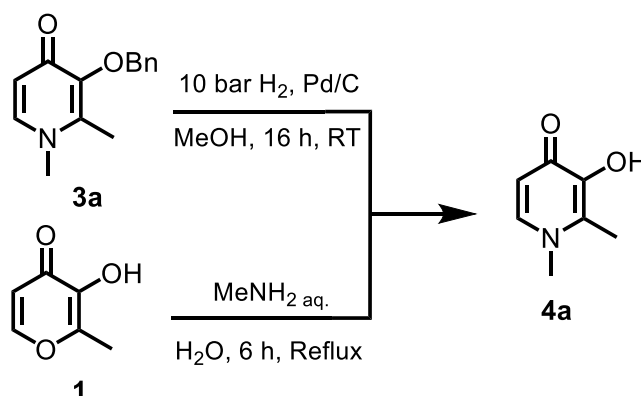
5.00 g (23.1 mmol, 1.0 eq) Benzyl-Maltol **1** wurden in 50 mL MeOH/H₂O (1:1) vorgelegt. 1.20 mL (0.79 g, 25.4 mmol, 1.1 eq) 40% MeNH₂ aq. und 2.03 g (50.9 mmol, 2.2 eq) NaOH wurden hinzugefügt und die Lösung wurde für zwei Stunden bei 75 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, die wässrige Phase wurde zweifach mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweifach mit je 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 10:1, R_f = 0.32). Es wurden 4.07 g (17.7 mmol, 77%) Benzyl-Thio-Deferipron **3** als braunes Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 7.57 (d, 1H, ³J = 7.5 Hz, 6-CH), 7.43-7.28 (m, 5H, Ph), 6.10 (d, 1H, ³J = 5.2 Hz, 5-CH), 5.02 (s, 2H, Ph-CH₂), 3.55 (s, 3H, NCH₃), 2.16 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 171.7 (C-4), 145.2 (C-3), 141.1 (C-2), 139.9 (C-6), 137.8 (C_{q,Ph}), 128.3 (CH_{Ph}), 128.1 (CH_{Ph}), 127.7 (CH_{Ph}), 115.6 (C-5), 71.7 (Ph-CH₂), 40.8 (NCH₃), 12.2 (CH₃) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₄H₁₆NO₂⁺ (MH⁺) ber.: 230.1176; gef.: 230.1176.

9.5.1.4 Synthese von Deferipron



Methode A:

1.00 g (4.36 mmol, 1.0 eq) Benzyl-Deferipron **3a** wurden in 25 mL Methanol gelöst und mit 100 mg Pd/C (5%) versetzt. Die Lösung wurde für 16 Stunden in einer 10 bar H₂-Atmosphäre gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit je 10 mL Ethanol und Ethylacetat versetzt, zentrifugiert und dekantiert. Die überstehende Lösung wurde mittels Spritzenfilter filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand *in vacuo* getrocknet. Es wurden 0.57 g (4.09 mmol, 94%) Deferipron **4a** als farbloser Feststoff erhalten.

Methode B:

1.00 g (7.93 mmol, 1.0 eq) Maltol **1** wurde in 20 mL H₂O mit 880 µL (17.5 mmol, 2.2 eq) 40% MeNH₂ aq. Versetzt. Die Lösung wurde für sechs Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der erhaltene Rückstand wurde in wenig H₂O aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Nach 16 Stunden Kühlung wurde der kristalline Niederschlag mittels Filtration abgetrennt und *in vacuo* getrocknet. Es wurden 0.43 g (3.10 mmol, 39%) Deferipron **4a** als farbloser Feststoff erhalten.

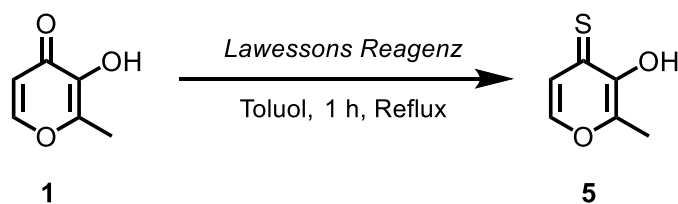
¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 7.53 (d, 1H, ³J = 7.3 Hz, 6-CH), 6.06 (d, 1H, ³J = 7.3 Hz, 5-CH), 3.61 (s, 3H, NCH₃), 2.25 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 168.8 (C-4), 145.3 (C-3), 138.0 (C-6), 129.2 (C-2), 110.1 (C-5), 40.9 (NCH₃), 11.6 (CH₃) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₇H₁₀NO₂⁺ (MH⁺) ber.: 140.1546; gef.: 140.1548.

Die Darstellung der Derivate **4b** und **4c** erfolgte analog.

9.5.1.5 Synthese von Thio-Maltol



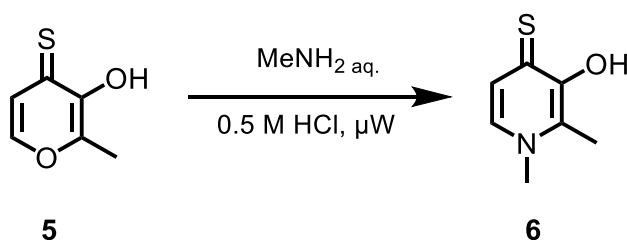
0.40 g (3.17 mmol, 2.0 eq) Maltol **1** wurden in 25 mL Toluol gelöst und mit 0.64 g (1.58 mmol, 1.0 eq) *Lawessons Reagenz* versetzt. Die Lösung wurde eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM, $R_f = 0.33$). Es wurden 0.36 g (2.53 mmol, 80%) Thiomaltol **5** als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): $\delta = 8.24$ (s, 1H, OH), 8.07 (d, 1H, $^3J = 5.2$ Hz, 6-CH), 7.33 (d, 1H, $^3J = 5.2$ Hz, 5-CH), 2.38 (s, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): $\delta = 185.5$ (C-4), 150.0 (C-2), 148.5 (C-6), 146.3 (C-3), 124.3 (C-5), 14.8 (CH_3) ppm.

HRMS: (ESI $^+$, MeOH) für $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2\text{S}^+$ (MH^+) ber.: 143.1721; gef.: 143.1720.

9.5.1.6 Synthese von Thio-Deferipron



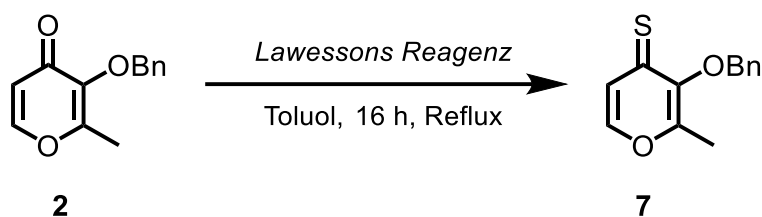
70.0 mg (0.49 mmol, 1.0 eq) Thiomaltol wurden in 2.0 mL 0.5 M Salzsäure gelöst und mit folgendem Programm im Mikrowellenreaktor umgesetzt: 5 Minuten bei 65 °C; 90 Sekunden bei 165 °C mit $P = 300$ W. Die Lösung wurde mit 10 mL Wasser versetzt und dreifach mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 62.1 mg (0.40 mmol, 82%) Thio-Deferipron als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 300 K, DMSO-d_6): δ = 7.65 (d, 1H, 3J = 6.6 Hz, 6-CH), 7.28 (d, 1H, 3J = 5.2 Hz, 5-CH), 3.81 (NCH₃, 2.42 (s, 3H, CH₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO-d_6): δ = 193.4 (C-4), 156.8 (C-2), 151.8 (C-3), 137.2 (C-6), 133.8 (C-5), 42.3 (NCH₃), 12.7 (CH₃) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₇H₁₀NOS (MH⁺) ber.: 156.0478; gef.: 156.0478.

9.5.1.7 Synthese von Benzyl-Thiomaltol **7**



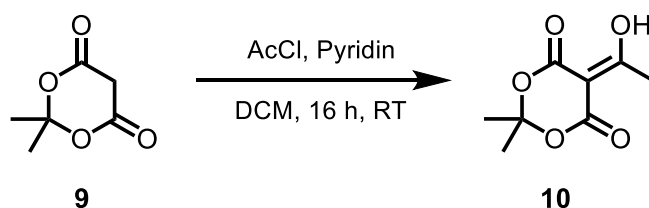
0.50 g (2.31 mmol, 2.0 eq) Benzyl-Maltol **2** wurden in 25 mL Toluol gelöst und mit 0.47 g (1.16 mmol, 1.0 eq) *Lawessons Reagenz* versetzt. Die Lösung wurde über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM:MeOH 20:1, R_f = 0.38). Es wurden 0.49 g (2.11 mmol, 91%) Benzyl-Thiomaltol **7** als braunes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO-d_6): δ = 7.97 (d, 1H, 3J = 5.2 Hz, 6-CH), 7.50-7.32 (m, 5H, Ph), 7.21 (d, 1H, 3J = 5.2 Hz, 5-CH), 5.05 (s, 2H, Ph-CH₂), 2.20 (s, 3H, CH₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO-d_6): δ = 193.4 (C-4), 156.8 (C-2), 151.8 (C-3), 147.5 (C-6), 136.7 (C_{q,Ph}), 128.6 (CH_{Ph}), 128.2 (CH_{Ph}), 128.1 (CH_{Ph}), 128.0 (C-5), 71.4 (Ph-CH₂), 15.0 (CH₃) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₃H₁₂O₂SNa (MNa⁺) ber.: 255.0451; gef.: 255.0513.

9.5.1.8 Synthese von Acetyl-Meldrumssäure



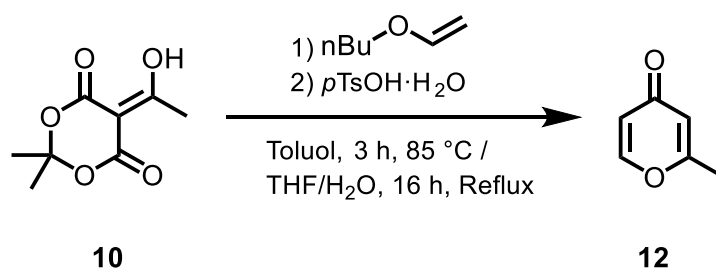
3.00 g (20.8 mmol, 1.0 eq) Meldrumssäure **9** wurden in 25 mL Dichlormethan gelöst und mit 3.40 mL (3.29 g, 41.6 mmol, 2.0 eq) Pyridin versetzt. Unter Eiskühlung wurden 1.48 mL (1.63 g, 20.8 mmol, 1.0 eq) Acetylchlorid hinzugefügt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 50 mL 1 M Salzsäure hinzugefügt, die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit je 75 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde *in vacuo* getrocknet. Es wurden 3.63 g (19.5 mmol, 94%) Acetyl-Meldrumssäure **10** als brauner Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, CDCl_3): δ = 15.1 (s, 1H, OH), 2.66 (s, 3H, CH_3), 1.72 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, CDCl_3): δ = 194.7 (COH), 170.3 (CO), 160.6 ($\text{C}_{\text{q,Acetal}}$), 105.1 ($\text{C}_{\text{q,Enol}}$), 27.0 ($(\text{CH}_3)_2$), 23.7 (CH_3) ppm.

HRMS: (ESI^+ , MeOH) für $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_5^+$ (MH^+) ber.: 187.1630; gef.: 187.1633.

9.5.1.9 Synthese von 2-Methyl-(4*H*)- γ -pyranon



0.50 g (2.20 mmol, 1.0 eq) Acetyl-Meldrumssäure **10** wurden in 6 mL Toluol gelöst und mit 1.60 mL (1.23 g, 12.2 mmol, 5.5 eq) frisch destilliertem *n*-Butylvinylether versetzt. Die Lösung wurde für drei Stunden bei 85 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 16 mL THF/H₂O aufgenommen und mit 49 mg (0.22 mmol, 0.1 eq) *para*-Toluolsulfonsäure Hydrat versetzt. Die Lösung wurde über Nacht unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Phase wurde mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Die wässrige Phase wurde dreifach mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 40:1, $R_f = 0.22$). Es wurden 0.16 g (1.45 mmol, 66%) 2-Methyl-(4*H*)- γ -Pyranon **12** als gelbes Öl erhalten.

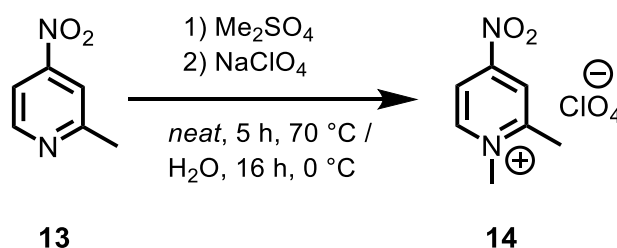
¹H-NMR (500 MHz, 300 K, CDCl₃): δ = 7.68 (dd, 1H, $^3J = 6.0$ Hz, $^4J = 0.3$ Hz, 6-CH), 6.28 (dd, 1H, $^3J = 6.0$ Hz, $^4J = 6.0$ Hz, 5-CH), 6.17-6.13 (m, 1H, 3-CH), 2.27 (d, 3H, $^4J = 0.8$ Hz, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, CDCl₃): δ = 179.3 (C-2), 166.2 (C-4), 155.1 (C-6), 116.6 (C-5), 115.6 (C-3), 19.9 (CH₃) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₆H₇O₂ (MH⁺) ber.: 111.1130; gef.: 111.1129.

Die Darstellung von Verbindung **15** aus **12** erfolgte analog zur Darstellung von **4a** aus **1**.

9.5.1.10 Synthese von 1,2-Dimethyl-3-nitropyridinium-perchlorat



100 mg (0.72 mmol, 1.0 eq) 2-Methyl-4-nitropyridin **13** wurden mit 206 μL (274 mg, 2.17 mmol, 3.0 eq) Dimethylsulfat versetzt und für fünf Stunden bei 70 $^\circ\text{C}$ gerührt. Nach dem Abkühlen der Lösung wurden 700 μL Wasser und 500 μL ges. $\text{NaClO}_4_{\text{aq}}$ hinzugefügt und die Lösung wurde über Nacht bei 4 $^\circ\text{C}$ gelagert. Die erhaltene Lösung wurde mittels *rp-hplc* (5% auf 15% MeCN in 20 Min) gereinigt. Es wurden 50.9 mg (0.20 mmol, 28%) 1,2-Dimethyl-3-Nitropyridinium-Perchlorat **14** als farbloser Feststoff erhalten.

^1H -NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-d_6): δ = 9.32 (d, 1H, 3J = 6.8 Hz, 6-CH), 8.88 (d, 1H, 4J = 2.5 Hz, 3-CH), 8.67 (dd, 1H, 3J = 6.8 Hz, 4J = 2.5 Hz, 5-CH), 4.33 (s, 3H, NCH_3), 2.92 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-d_6): δ = 149.5 (C-6), 122.5 (C-3), 118.7 (C-5), 46.3 (NCH_3), 20.4 (CH_3) ppm.

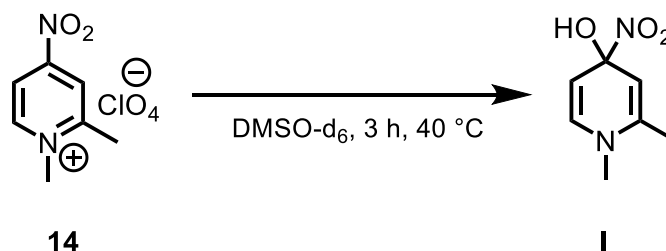
Da 1,2-Dimethyl-Nitropyridinium-Perchlorat **14** bereits im NMR-Rohr zunächst zu 1,2-Dimethyl-4-Nitro-1,4-Dihydropyridin-4-ol **I** und anschließend zu 1,2-Dimethyl-(*IH*)- γ -Pyridinon **15** umlagert, konnte keine vollständige ^{13}C -NMR Analyse durchgeführt werden.

HRMS: (ESI^+ , MeOH) für $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2$ (MH^+) ber.: 153.0658; gef.: 153.0659.

HPLC (0.45 mL/min, 5-15% MeCN in H_2O in 10 min):
 t_r = 2.06 min, Reinheit 99%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 5-10% MeCN in H_2O in 20 min):
 t_r = 4.34 min, Reinheit 82%.

9.5.1.11 Synthese von 1,2-Dimethyl-4-Nitro-1,4-dihydropyridin-4-ol

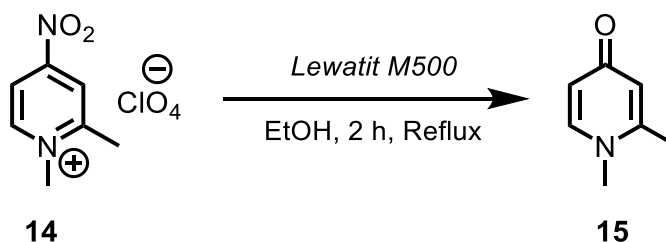


3.00 mg (11.9 μmol , 1.0 eq) 1,2-Dimethyl-3-Nitropyridinium-Perchlorat **14** wurden in 600 μL DMSO- d_6 gelöst und für drei Stunden bei 40 °C gerührt. Mittels ^1H NMR-Spektroskopie wurden 94% Umsatz bestimmt. Nach weiteren 72 h war der Umsatz vollständig.

^1H -NMR (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 8.55 (d, 1H, 3J = 7.2 Hz, 6-CH), 7.19 (d, 1H, 4J = 2.8 Hz, 3-CH), 7.12 (dd, 1H, 3J = 7.2 Hz, 4J = 2.9 Hz, 5-CH), 3.97 (s, 3H, NCH₃), 2.60 (s, 3H, CH₃) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 169.8 (C-4), 156.3 (C-2), 147.2 (C-6), 114.3 (C-3), 112.3 (C-5), 43.1 (NCH₃), 19.5 (CH₃) ppm

9.5.1.12 Synthese von 1,2-Dimethyl-(1H)- γ -pyridinon



25.0 mg (99 μmol , 1.0 eq) 1,2-Dimethyl-3-Nitropyridinium-Perchlorat **14** wurden in 2.0 mL Ethanol gelöst mit 184 mg *Lewatit M500* versetzt und für zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde der Ionentauscher abfiltriert und das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 9.60 mg (78 μmol , 79%) 1,2-Dimethyl-(1H)- γ -Pyridinon **15** als farbloser Feststoff erhalten.

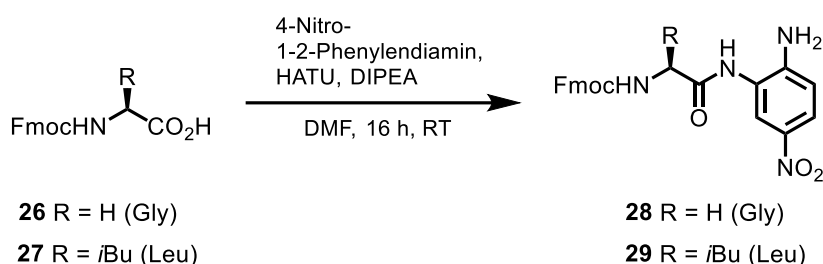
^1H -NMR (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 7.57 (d, 1H, 3J = 6.8 Hz, 6-CH), 6.00 (d, 1H, 4J = 2.8 Hz, 4J = 0.6 Hz, 3-CH), 5.94 (dd, 1H, 3J = 6.8 Hz, 4J = 2.8 Hz, 5-CH), 3.54 (s, 3H, NCH₃), 2.22 (d, 3H, 4J = 0.6 Hz, CH₃) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 177.5 (C-4), 148.9 (C-2), 142.5 (C-6), 117.4 (C-3), 115.9 (C-5), 39.5 (NCH₃), 18.9 (CH₃) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₇H₉NONa⁺ (MNa⁺) ber.: 146.0576; gef.: 146.0576.

9.5.2 Synthese von Thioaminosäure-Aktivestern

9.5.2.1 Synthesen der Anilide



5.00 g (16.8 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Gly-OH **26** und 12.8 g (33.7 mmol, 2.0 eq) HATU wurden bei Raumtemperatur in 30 mL DMF gelöst. 5.80 mL (34.1 mmol, 2.0 eq) DIPEA und 2.61 g (17.0 mmol, 1.1 eq) 4-Nitro-1,2-phenyldiamin wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde in 250 mL ges. NaCl-Lösung aufgenommen. Die wässrige Phase wurde vierfach mit je 250 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH:EtOAc 1:1, R_f = 0.10). Es wurden 5.75 g (13.3 mmol, 79%) des Anilids **28** als gelber Feststoff erhalten. Die Darstellung von **29** erfolgte analog.

^1H -NMR (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6):

δ = 9.29 (brs, 1H, CONH), 8.16 (d, 4J = 2.6 Hz, 1H, 6-CH), 7.90 (d, 3J = 7.5 Hz, 2H, Ph), 7.86 (dd, 3J = 9.1 Hz, 4J = 2.6 Hz, 1H, 4-CH), 7.73 (d, 3J = 7.5 Hz, 2H, Ph), 7.63 (t, 3J = 5.9 Hz, 1H, NH), 7.42 (t, 3J = 7.5 Hz, 2H, Ph), 7.34 (t, 3J = 7.5 Hz, 2H, Ph), 6.76 (d, 3J = 9.1 Hz, 1H, 3-CH), 6.49 (brs, 2H, NH₂), 4.33 (d, 3J = 7.0 Hz, 2H, Fmoc-CH₂), 4.25 (m_c, 1H, Fmoc-CH), 3.87 (d, 3J = 5.9 Hz, 2H, α -CH₂) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 168.7 (CO), 156.6 (CO_{Fmoc}), 149.4 (C_{q, Fmoc}), 143.8 (C-2), 140.7 (5-C), 135.4 (Ph), 127.6 (Ph), 127.1 (Ph), 125.2 (Ph), 123.1 (Ph),

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₂₃H₂₀N₄O₅⁺ (MH⁺) ber.: 433.1506; gef.: 433.1509.

28 R = H (Gly)

29 R = *i*Bu (Leu)

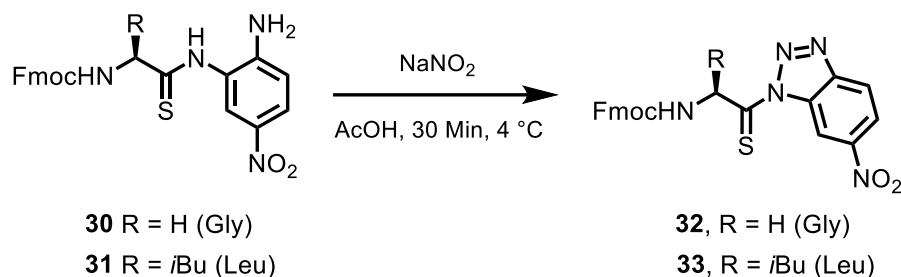
30 R = H (Gly)

31 R = *i*Bu (Leu)

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 11.1 (s, 1H, CSNH), 7.95 (dd, ³J = 9.1 Hz, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, 4-CH), 7.91-7.89 (m, 3H, Ph + 6-CH), 7.81-7.71 (m, 3H, Ph + NH), 7.42 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, Ph), 7.33 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, Ph_{Fmoc}), 6.78 (d, ³J = 9.1 Hz, 1H, 3-CH), 6.54 (brs, 2H, NH₂), 4.35-4.17 (m, 3H, Fmoc-CH₂ + Fmoc-CH), 3.86-3.79 (m, 2H, α-CH₂) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₂₃H₂₀N₄O₄S⁺ (MH⁺) ber.: 471.1097; gef.: 471.1100.

9.5.2.3 Synthesen der Aktivester



0.45 mmol (1.0 eq) des jeweiligen Thioamids **30/31** wurden in 10 mL Essigsäure vorgelegt und portionsweise wurden 0.68 mmol (1.6 eq) Natriumnitrit unter Eiskühlung zugegeben. Die Lösung wurde für 30 Minuten gerührt. Durch die Zugabe von kaltem Wasser wurde der Aktivester **32/33** als farbloser Feststoff ausgefällt, der mittels Filtration isoliert und unmittelbar in der Peptidsynthese eingesetzt wurde.

9.5.2.4 Aktivester in der Peptidsynthese

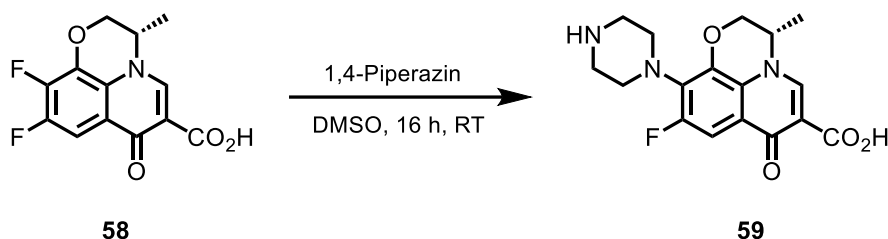
Die Kupplung der Thioamid-Aktivester erfolgte in einer manuellen Peptidsynthese bei Raumtemperatur. Hierzu wurden 3.0 eq des Thioamid-Aktivesters mit 5.0 eq DIPEA in wenig DCM gelöst und für eine Stunde mit dem entsprechenden Harz versetzt. Nach mehrmaligem Waschen mit DCM wurde der polymere Träger zurück in den Synthesizer überführt und die automatisierte Peptidsynthese wurde fortgesetzt.

9.5.3 Synthese der Hop-Aminosäure

Die experimentellen Durchführungen zur Synthese der Fmoc-geschützten Hop-Aminosäure **50/51** können in *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 8450-8456 erhalten werden.^[242]

9.5.4 Synthesen der Levofloxacin-/Cycloserin-Derivate

9.5.4.1 Synthese von (S)-9-Fluoro-3-methyl-7-oxo-10-(piperazin-1-yl)-2,3-dihydro-7H-[1,4]oxazino[2,3,4-ij]chinolin-6-carbonsäure



0.10 g (0.35 mmol, 1.0 eq) des Fluorochinolons **58** und 0.18 g (2.14 mmol, 6.1 eq) 1,4-Piperazin wurden in 1.5 mL Dimethylsulfoxid gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde kaltes Aceton hinzugefügt und der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde in kalten Diethylether getropft. Die entstandene Suspension wurde zentrifugiert, die überstehende Lösung wurde abdekantiert und der erhaltene Rückstand erneut mit Diethylether gewaschen. Der erhaltene Rückstand wurde *in vacuo* getrocknet. Es wurden 0.11 g (0.32 mmol, 91%) Desmethyl-Levofloxacin **59** als gelber Feststoff erhalten.

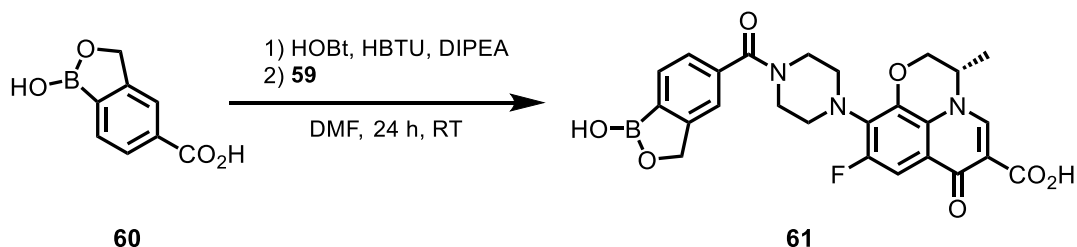
¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 8.96 (s, 1H, 5-CH), 7.57 (d, 1H, ³*J* = 12.5 Hz, 8-CH), 4.91 (ddq, 1H, ³*J* = 6.8 Hz, ³*J* = 3.7 Hz, ³*J* = 2.1 Hz, 3-CH), 4.56 (dd, 1H, ³*J* = 11.5 Hz, ³*J* = 1.7 Hz, 2-CH₂), 4.36 (dd, ³*J* = 11.5 Hz, ³*J* = 2.3 Hz, 2-CH₂), 3.27-3.24 (m, 4H, 13-CH₂), 2.87-2.78 (m, 4H, 14-CH₂), 1.44 (d, 3H, ³*J* = 6.8 Hz, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 176.4 (C-7), 166.1 (CO₂H), 155.6 (C-9), 146.1 (C-5), 140.2 (C-11), 132.5 (C-10), 124.8 (C-4a), 119.6 (C-7a), 106.6 (C-6), 103.4 (C-8), 68.0 (C-2), 54.8 (C-3), 51.5 (C-13), 46.2 (C-14), 17.9 (C-1) ppm.

¹⁹F-NMR (282 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = -121.0 (s, 1F, 9-CF) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₇H₁₉N₃O₄F⁺ (MH⁺) ber.: 348.1354; gef.: 348.1346.

9.5.4.2 Synthese von (S)-9-Fluoro-10-(4-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[c][1,2]oxaborol-5-carbonyl)piperazin-1-yl)-3-methyl-7-oxo-2,3-dihydro-7H-[1,4]oxazino[2,3,4-ij]quinolin-6-carbonsäure



5.73 mg (32.2 μmol , 1.0 eq) 1-Hydroxy-1,3-dihydrobenzo[c][1,2]oxaborol-5-carbonsäure **60** wurde zusammen mit 4.53 mg (32.2 μmol , 1.0 eq) HOBt, 12.2 mg (32.2 μmol , 1.0 eq) HBTU und 13.7 μL (32.2 μmol , 1.0 eq) DIPEA in 3 mL DMF vorgelegt und für 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 11.2 mg (32.2 μmol , 1.0 eq) Desmethyl-Levofloxacin **59** hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand in wenig $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ aufgenommen und gefriergetrocknet. Der erhaltene Rückstand wurde mittels semipräparativer HPLC (20% auf 60% MeCN in H_2O in 30 Minuten) aufgereinigt. Es wurden 6.60 mg (13.0 μmol , 40%) von Verbindung **61** als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO-d_6): δ = 9.30 (s, 1H, B-OH), 8.98 (s, 1H, 5-CH), 7.81 (d, 3J = 7.6 Hz, 1H-21-CH), 7.48 (d, 1H, 3J = 12.5 Hz, 8-CH), 7.40 (d, 3J = 7.6 Hz, 20-CH), 4.92 (m, 1H, 3-CH), 4.59 (dd, 1H, 3J = 11.5 Hz, 3J = 1.7 Hz, 2-CH₂), 4.36 (dd, 3J = 11.7 Hz, 3J = 2.3 Hz, 2-CH₂), 3.51-3.41 (m, 4H, 13-CH₂), 3.41-3.20 (m, 4H, 14-CH₂), 1.44 (d, 3H, 3J = 6.8 Hz, CH₃) ppm.

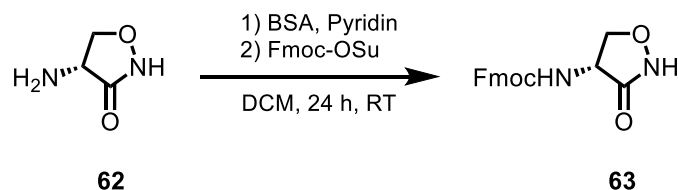
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO-d_6): δ = 176.4 (C-7), 169.1 (C-16), 165.9 (CO₂H), 156.1 (C-9), 153.9 (C-21a), 146.1 (C-5), 140.1 (C-11), 137.8 (C-18a), 131.4 (C-17), 131.1 (C-10), 130.4 (C-21), 125.3 (C-20), 124.6 (C-4a), 119.7 (C-18), 11.6 (C-7a), 106.6 (C-6), 102.9 (C-8), 69.7 (C-7), 67.9 (C-2), 54.6 (C-3), 50.0 (C-14), 42.1 (C-13), 17.6 (CH₃) ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (282 MHz, 300 K, DMSO-d_6): δ = -119.7 (s, 1F, 9-CF) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_7\text{FB}^+$ (MH^+) ber.: 508.1686; gef.: 508.1679.

HPLC: (20% auf 60% MeCN in H_2O in 10 min); t_r = 6.97 min.

9.5.4.3 Synthese von Fmoc-D-Cycloserin



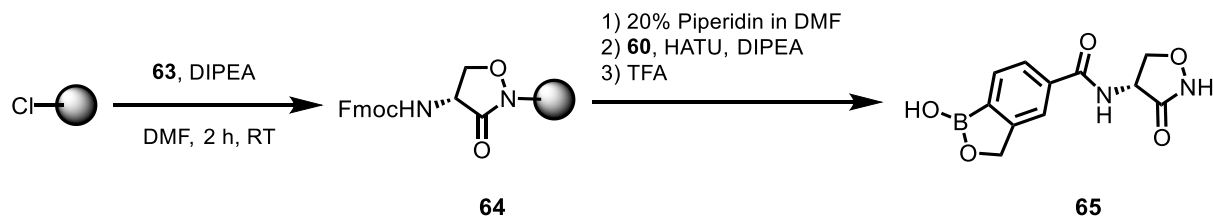
Unter Argon-Atmosphäre wurden 0.40 g (3.92 mmol, 1.0 eq) D-Cycloserin **62** und 2.4 mL (1.99 g, 9.80 mmol, 2.50 eq) *Bis*(trimethylsilyl)acetamid in 3 mL absolutem Dichlormethan vorgelegt und für 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 6.3 mL (6.17 g, 6.20 mmol, 20 eq) Pyridin wurde die Reaktionslösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. 1.32 g (3.92 mmol, 1.0 eq) Fmoc-OSu wurden portionsweise hinzugegeben und die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde in 10 mL Ethylacetat. Die organische Phase wurde vierfach mit je 4 mL 10 mM HCl_{aq.} und gesättigter NaCl_{aq.} gewaschen und anschließend über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 20:1, $R_f = 0.34$). Es wurden 1.21 g (3.73 mmol, 95%) Fmoc-D-Cycloserin **63** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 7.92 (d, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, α -NH), 7.90 (d, 2H, $^3J = 7.6$ Hz, CH_{Fmoc,ar.}), 7.71 (m, 2H, CH_{Fmoc,ar.}), 7.33 (t, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, CH_{Fmoc,ar.}), 4.60-4.53 (m, 1H, α -CH), 4.49 (dd, 1H, $^2J = 9.9$ Hz, $^3J = 8.4$ Hz, β -CH), 4.35-4.32 (m, 2H, 9-CH₂), 4.25-4.22 (m, 1H, 8-CH), 3.94 (dd, 1H, $^2J = 10.5$ Hz, $^3J = 8.2$ Hz, β -CH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 171.4 (CO), 156.0 (CO_{Fmoc}), 143.8 (2C, C_{q,Fmoc}), 140.8 (C_{q, Fmoc}), 127.1 (2C, CH_{Fmoc,ar.}), 125.2 (2C; CH_{Fmoc,ar.}), 120.2 (CH_{Fmoc,ar.}), 71.6 (β -C), 65.8 (9-CH₂), 52.6 (α -C), 46.6 (8-CH) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₈H₁₆N₂O₄Na⁺ (MNa⁺) ber.: 347.1002; gef.: 347.1003.

9.5.4.4 Synthese von (*R*)-1-Hydroxy-*N*-(3-Oxaisoxazolidinin-4-yl)-1,3-Dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-5-Carboxamid



Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Beladung des 2-CTC-Harzes mit Fmoc-geschützten Aminosäuren wurde Fmoc-D-Cycloserin analog auf das Harz beladen mit dem Unterschied, dass hier 3.0 Äquivalente der Aminosäure eingesetzt und die Beladungszeit auf 120 Minuten angepasst wurde. Mittels UV/Vis-Spektroskopie konnte eine Beladung von ca. 0.70 mmol/g abgeschätzt werden. In einer manuellen Peptidsynthese wurden 0.50 g des beladenen Harzes in eine Glasfritte überführt und zweifach für je zehn Minuten mit 20% Piperidin in DMF behandelt, um die Fmoc-Schutzgruppe abzuspalten. Anschließend wurden 0.18 g (1.00 mmol, 3.0 eq) Boroxol **60** mit 0.14 g (1.00 mmol, 3.0 eq) HOAt, 0.38 g (1.00 mmol, 3.0 eq) HATU und 570 μL DIPEA (0.43 g, 3.35 mmol, 10 eq) DIPEA in DMF gelöst und zum Harz gegeben. Nach einer Stunde Reaktionszeit wurde das Harz mit DMF, DCM und MeOH gewaschen, bevor für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 95% TFA_{aq} das Dipeptid **65** vom polymeren Träger abgespalten wurde. Nach Präzipitation und Waschen gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Peptidsynthese wurden 20 mg (0.08 mmol, 23% bzgl. der abgeschätzten Harzbeladung) von Verbindung **65** als farbloser Feststoff erhalten.

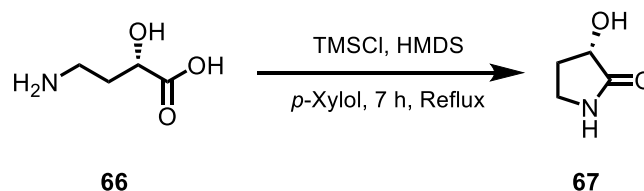
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, 300 K, DMSO-d_6): δ = 11.5 (s, 1H, δ -NH), 9.34 (s, 1H, B-OH), 9.01 (d, 3J = 8.1 Hz, α -NH), 7.88 (s, 1H, 2-CH), 7.84-7.80 (m, 2H, 4-CH+5-CH), 5.08-5.01 (m, 3H, α -CH+Ph-CH₂), 4.58 (dd, 1H, 2J = 9.8 Hz, 3J = 8.5 Hz, β -CH), 4.11 (dd, 1H, 2J = 11 Hz, 3J = 8.5 Hz, β -CH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO-d_6): δ = 171.2 (CO), 167.1 (CONH), 154.5 (C-1), 136.1 (C-3), 134.4 (C-6), 130.7 (C-4), 126.3 (C-5), 120.5 (C-2), 71.9 (β -C), 51.6 (α -C) ppm.

HRMS: (ESI^+ , MeOH) für $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_5\text{BNa}^+$ (MNa^+) ber.: 285.0655; gef.: 285.0663.

9.5.5. Synthese der Hypusin-Derivate

9.5.5.1 Synthese von (*S*)-3-Hydroxypyrrolidin-2-on

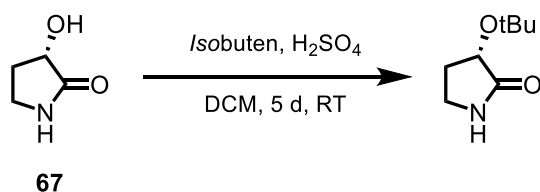


2.00 g (16.8 mmol, 1.0 eq) (*S*)-4-Amino-2-Hydroxybuttersäure **66** wurden in 40 mL *p*-Xylol gelöst und mit 25 mL (19.1 g, 108 mmol, 7.0 eq) 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan und fünf Tropfen Trimethylsilylchlorid versetzt. Die Lösung wurde sieben Stunden unter Rückfluss erhitzt und das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 20 mL THF/H₂O (9:1) gelöst und mit konzentrierter Schwefelsäure angesäuert. Das Lösungsmittelgemisch wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CHCl₃/MeOH 7:1, *R_f* = 0.33). Es wurden 1.68 g (16.6 mmol, 99%) (*S*)-3-Hydroxypyrrolidin-2-on **67** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 7.62 (bs, 1H, NH), 5.35 (d, 1H, ³*J* = 5.5 Hz, OH), 3.97 (dt, 1H, ³*J* = 8.2 Hz, ³*J* = 5.5 Hz, 3-CH), 3.17-3.05 (m, 2H, 5-CH₂), 2.28-2.22 (m, 1H, 4-CH_{pro(S)}) 1.77-1.70 (dq, 1H, ³*J* = 12 Hz, ⁵*J* = 8.5 Hz, 4-CH_{pro(R)}) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 176.2 (C-2), 68.4 (C-3), 37.5 (C-5), 30.4 (C-4) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₄H₇NO₂⁺ (MH⁺) ber.: 102.0550; gef.: 102.0550.

9.5.5.2 Synthese von (*S*)-3-*tert*-Butoxypyrrolidin-2-on

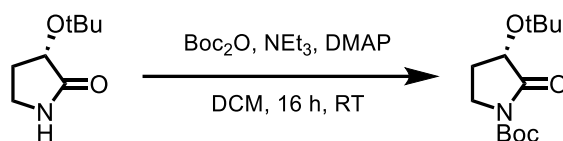
1.68 g (16.6 mmol, 1.0 eq) (*S*)-3-Hydroxypyrrolidin-2-on **67** wurden in 15 mL Dichlormethan gelöst, in einen Druckreaktor überführt und auf 0 °C abgekühlt. Es wurden 1.80 mL konzentrierte Schwefelsäure und 150 mL *Isobuten*-Lösung (ca. 8% in Dichlormethan, TCI Deutschland) hinzugefügt und die Lösung wurde für fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Umsatz der Reaktion wurde mittels ^1H -NMR Spektroskopie bestimmt, indem ca. 5 mL der Reaktionslösung unter Eiskühlung entnommen und das Lösungsmittel dieser Probe unter vermindertem Druck entfernt wurde. Der erhaltene Rückstand wurde in 500 μL DMSO- d_6 gelöst, ein ^1H -NMR Spektrum wurde aufgezeichnet und der Umsatz wurde am Integralverhältnis der jeweiligen 3-CH Signale bestimmt. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert, die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde dreifach mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 2.04 g (13.0 mmol, 78%) (*S*)-3-*tert*-Butoxypyrrolidin-2-on als farbloser Feststoff erhalten.

^1H -NMR (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 7.64 (bs, 1H, NH), 4.07 (t, 1H, 3J = 8.1 Hz, 3-CH), 3.14-3.06 (m, 2H, 5- CH_2), 2.31-2.21 (m, 1H, 4- $\text{CH}_{\text{pro}(\text{S})}$), 1.79-1.64 (dq, 1H, 3J = 12 Hz, 5J = 8.4 Hz, 4- $\text{CH}_{\text{pro}(\text{R})}$), 1.15 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 175.2 (C-2), 73.8 ($\text{C}_{\text{q},t\text{Bu}}$), 69.1 (C-3), 37.5 (C-5), 30.9 (C-4), 28.2 ($(\text{CH}_3)_3$) ppm.

HRMS: (ESI $^+$, MeOH) für $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{Na}^+$ (MNa^+) ber.: 180.0995; gef.: 180.0997.

9.5.5.3 Synthese von (*S*)-*N*-Boc-3-*tert*-Butoxypyrrolidin-2-on



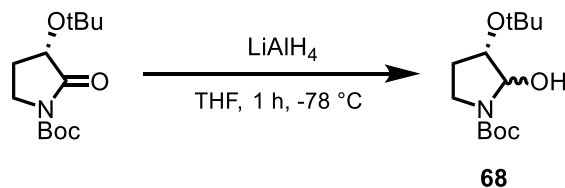
2.04 g (13.0 mmol, 1.0 eq), (*S*)-3-*tert*-Butoxypyrrolidin-2-on wurden unter Eiskühlung in 23 mL DCM gelöst und mit 3.60 mL (2.63 g, 2.0 eq) Triethylamin, sowie 1.59 g (13.0 mmol, 1.0 eq) 4-(Dimethylamino)-Pyridin versetzt. Portionsweise wurde 5.67 g (26.0 mmol, 2.0 eq) Boc-Anhydrid hinzugefügt und die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH:EtOAc 4:1, $R_f = 0.21$). Es wurden 2.52 g (9.79 mmol, 75%) (*S*)-*N*-Boc-3-*tert*-Butoxypyrrolidin-2-on als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): $\delta = 4.38\text{--}4.34$ (dd, 1H, $^3J = 10$ Hz, $^3J = 8.3$ Hz, 3-CH), 3.60 (ddt, $^3J = 18$ Hz, $^3J = 8.9$ Hz, $^3J = 1.8$ Hz, 5-CH), 3.40 (ddd, $^3J = 10$ Hz, $^3J = 6.7$ Hz, $^3J = 3.6$ Hz, 5-CH), 2.22-2.17 (m, 1H, 4-CH), 1.76-1.65 (m, 1H, 4-CH), 1.45 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_{3,\text{Boc}}$), 1.16 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_{3,\text{tBu}}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): $\delta = 172.6$ (C-2), 149.8 (CO_{Boc}), 81.6 ($\text{C}_{\text{q,Boc}}$), 74.4 ($\text{C}_{\text{q,tBu}}$), 70.2 (C-3), 41.5 (C-5), 28.0 ($(\text{CH}_3)_{3,\text{tBu}}$), 27.6 ($(\text{CH}_3)_{3,\text{Boc}}$), 27.5 (C-4) ppm.

HRMS: (ESI $^+$, MeOH) für $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{NO}_4^+$ (MNa^+) ber.: 258.3329; gef.: 258.3319.

9.5.5.4 Synthese von *tert*-Butyl (3*S*)-3-(*tert*-butoxy)-(2*RS*)-2-hydroxypyrrolidin-1-carboxylat



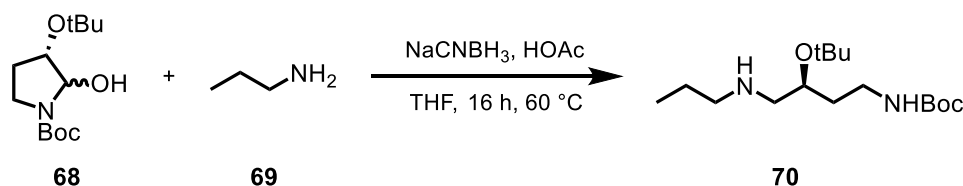
200 mg (0.78 mmol, 1.0 eq) (*S*)-*N*-Boc-3-*tert*-Butoxypyrrolidin-2-on wurden unter Argon-Atmosphäre in 8 mL absolutem Tetrahydrofuran gelöst und auf -78 °C abgekühlt. 44.9 mg (1.17 mmol, 2.0 eq) Lithiumaluminiumhydrid wurden in 5 mL absolutem Tetrahydrofuran gelöst und ebenfalls auf -78 °C abgekühlt. Die Pyrrolidinon-Lösung wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten zur Hydrid-Lösung getropft und die resultierende Lösung wurde für eine weitere Stunde bei -78 °C gerührt. 5 mL NaOH_{aq.} (10%) wurden hinzugefügt und nach Beenden der Gasentwicklung wurde der entstandene Feststoff mittels Filtration abgetrennt. Der Filterkuchen wurde mehrfach mit Tetrahydrofuran gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand *in vacuo* getrocknet. Es wurden 200 mg (0.77 mmol, 99%) *tert*-Butyl-(3*S*)-3-(*tert*-butoxy)-(2*RS*)-2-hydroxypyrrolidine-1-carboxylat **68** (1:1 Gemisch beider Diastereomere) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 5.74 (d, 1H, ³*J* = 5.6 Hz, OH_{DS1}), 5.55 (d, 1H ³*J* = 5.6 Hz, OH_{DS2}), 4.99 (m, 2H, 2-CH_{DS1+2}), 3.84-3.79 (m, 2H, 3-CH_{DS1+2}), 3.27-3.24 (m, 4H, 5-CH_{2,DS1+2}), 2.14-2.03 (m, 4H, 4-CH_{2,DS1+2}), 1.41 (s, 9H, (CH₃)_{3,Boc,DS1+2}), 1.16 (s, 9H, (CH₃)_{3,*t*Bu,DS1+2}) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 153.6 (CO_{Boc}), 85.8 (C-2), 78.5 (C_{q,Boc}), 76.4 (C-3), 72.9 (C_{q,*t*Bu}), 70.2 (C-3), 43.7 (C-5), 30.2 (C-4), 28.1 ((CH₃)_{3,*t*Bu}), 28.0 ((CH₃)_{3,Boc}) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₃H₂₅NO₄Na⁺ (MNa⁺) ber.: 282.1676; gef.: 282.1676.

9.5.5.5 Synthese von *tert*-Butyl (*S*)-(3-(*tert*-butoxy)-4-(propylamino)butyl)carbamat



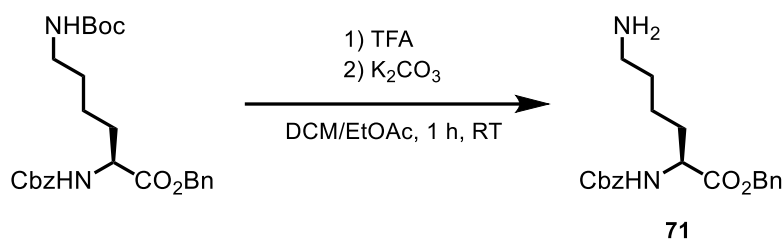
29 μL (21.0 mg, 0.36 mmol, 1.0 eq) *n*-Propylamin **69** und 161 mg (0.62 mmol, 1.7 eq) *tert*-Butyl-(3*S*)-3-(*tert*-butoxy)-(2*RS*)-2-hydroxypyrrolidine-1-carboxylat **68** wurden in 3 mL THF gelöst und anschließend mit 67.9 mg (1.08 mmol, 3.0 eq) Natriumcyanoborhydrid, sowie 41 μL (43.2 mg, 0.72 mmol, 2.0 eq) Essigsäure versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei 60 $^\circ\text{C}$ gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 10 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung hinzugefügt und die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde zweifach mit je 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH:EtOAc 1:1, $R_f = 0.50$). Es wurden 40.0 mg (0.13 mmol, 36%) *tert*-Butyl (*S*)-(3-(*tert*-butoxy)-4-(propylamino)butyl)carbamate **70** als gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO-d_6): $\delta = 6.76$ (d, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, 1-NH), 5.96 (s, 1H, 6-NH $_2^+$), 5.54 (s, 1H, 6-NH $_2^+$), 3.92-3.84 (m, 1H, 4-CH), 2.96 (dt, 2H, $^3J = 6.8$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, 2-CH $_2$), 2.80-2.59 (m, 2H, 5-CH $_2$), 2.71-2.68 (m, 2H, 7-CH $_2$), 1.70-1.49 (m, 4H, 3-CH $_2$, 8-CH $_2$), 1.38 (s, 9H, (CH $_3$) $_3$ Boc), 1.16 (s, 9H, (CH $_3$) $_3$ *t*Bu), 0.87-0.84 (m, 3H, 9-CH $_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO-d_6): $\delta = 155.6$ (CO $_{\text{Boc}}$), 77.5 (C $_{\text{q,Boc}}$), 74.1 (C $_{\text{q,tBu}}$), 65.5 (C-4), 56.7 (C-7), 55.2 (C-5), 36.3-35.9 (C-2), 34.2 (C-3), 28.4 ((CH $_3$) $_3$ *t*Bu), 28.2 ((CH $_3$) $_3$ Boc), 18.0 (C-8), 11.1 (C-9) ppm.

HRMS: (ESI $^+$, MeOH) für C $_{16}$ H $_{35}$ N $_2$ O $_3$ $^+$ (MH $^+$) ber.: 303.2642; gef.: 303.2644.

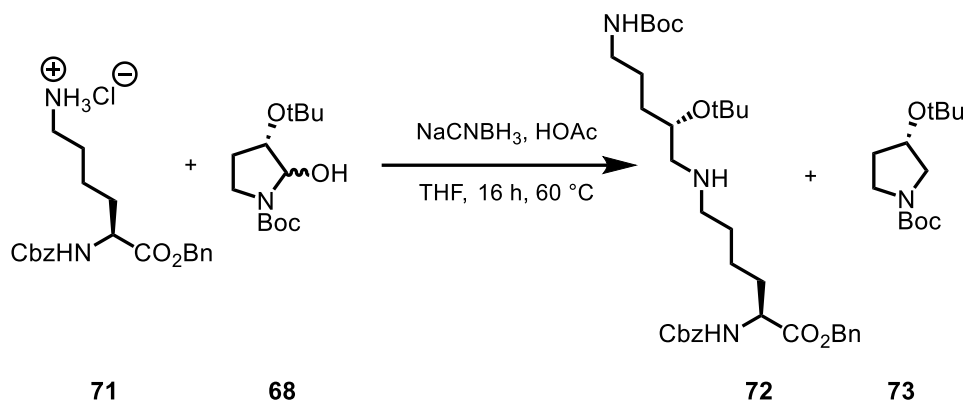
9.5.5.6 Synthese von Cbz-L-Lys-OBn



1.14 g (2.42 mmol, 1.0 eq Cbz-L-Lys(Boc)-OBn) wurde in 18 mL eines Gemisches aus Trifluoressigsäure und Dichlormethan (1:1) gelöst und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es wurde mehrfach mit Diethylether coevaporiert. Der erhaltene Rückstand wurde in 50 mL Ethylacetat gelöst und mit 0.25 M Salzsäure angesäuert. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit festem Kaliumcarbonat auf einen pH-Wert größer 10 gebracht. Die wässrige Phase wurde daraufhin dreifach mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 0.88 g (2.39 mmol, 99%) des salzfreien Lysin-Derivats **71** als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 7.78 (d, 1H, ³J = 7.6 Hz, α -NH), 7.48-7.27 (m, 10H, CH_{Ph}), 5.12 (s, 2H, Ph-CH₂), 5.03 (m, 2H, Ph-CH₂), 4.09-4.01 (m, 1H, α -CH), 2.80-2.66 (m, 2H, ϵ -CH₂), 1.72-1.56 (m, 2H, β -CH₂), 1.38-1.32 (m, 4H, δ -CH₂, γ -CH₂) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₂₁H₂₇N₂O₄⁺ (MH⁺) ber.: 371.1965; gef.: 371.1966.

9.5.5.7 Synthese von Cbz-L-Hpu(*t*Bu, Boc)-OMe

0.16 g (0.47 mmol, 1.0 eq) Cbz-L-Lys-OBn **71** und 0.18 g (0.70 mmol, 1.5 eq) *tert*-Butyl (3*S*)-3-(*tert*-butoxy)-(2*RS*)-2-hydroxypyrrolidine-1-carboxylat **68** wurden in 3.8 mL absolutem Tetrahydrofuran gelöst und mit 90.0 mg (1.41 mmol, 3.0 eq) Natriumcyanoborhydrid und 54 μ L (0.94 mmol, 2.0 eq) Essigsäure versetzt. Die Lösung wurde für 16 Stunden bei 60 °C gerührt. Es wurden 10 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung hinzugefügt und die wässrige Phase wurde dreifach mit je 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH/EtOAc 1:1, R_f = 0.64). Es wurden 30.2 mg (56 μ mol, 12%) des geschützten Hypusin-Derivats **72** als farbloses Öl erhalten.

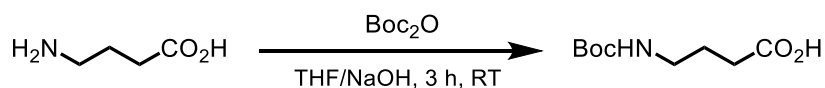
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 7.73 (d, 1H, 3J = 7.6 Hz, α -NH), 7.39-7.25 (m, 5H, Ph), 6.76 (t, 1H, 3J = 5.3 Hz, ι -NH), 5.99 (s, 1H, ϵ -NH), 5.03 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.05-4.00 (m, 1H, α -CH), 3.85 (quint., 1H, 3J = 5.3 Hz, η -CH), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 2.95 (dt, 2H, 3J = 6.7 Hz, 3J = 6.0 Hz, ι -CH₂), 2.81-2.63 (m, 2H, ζ -CH₂), 2.68 (t, 2H, 3J = 5.6 Hz, ϵ -CH₂), 1.73-1.48 (m, 6H, β -CH₂, δ -CH₂, θ -CH₂), 1.37 (s, 9H, (CH₃)_{3,Boc}), 1.32-1.26 (m, 2H, γ -CH₂), 1.15 (s, 9H, (CH₃)_{3,*t*Bu}) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 173.2 (CO₂Me), 156.6 (CO_{Cbz}), 156.1 (CO_{Cbz}), 137.0 (C_{q,Ph}), 128.8 (CH_{Ph}), 128.3 (CH_{Ph}), 128.1 (CH_{Ph}), 78.0 (C_{q,Boc}), 74.5 (C_{q,*t*Bu}), 66.0 (Ph-CH₂), 65.4 (ι -C), 57.4 (ϵ -C), 54.1 (α -C), 53.4 (ζ -C), 52.3 (OCH₃), 37.1 (ι -C), 34.5. (θ -C), 30.8 (β -C), 28.9 ((CH₃)_{3,Boc}), 28.7 ((CH₃)_{3,*t*Bu}), 24.5 (δ -C), 23.4 (γ -C) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₂₉H₅₀N₃O₇⁺ (MH⁺) ber.: 552.7330; gef.: 552.7332.

9.5.6 Synthesen der Desoxyhypusin-Derivate

9.5.6.1 Synthese von *N*-Boc- γ -Aminobuttersäure



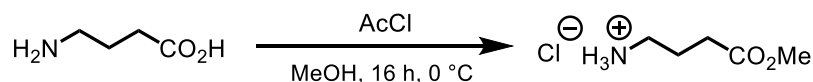
5.01 g (48.5 mmol, 1.0 eq) γ -Aminobuttersäure wurden unter Eiskühlung in 75 mL Tetrahydrofuran gelöst. 50 mL 1 M NaOH, sowie anschließend 13.3 g (60.9 mmol, 1.3 eq) Boc-Anhydrid wurden hinzugefügt und die Lösung für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der erhaltene Rückstand wurde in 30 mL Wasser aufgenommen und mit 50 mL Ethylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 1 M Salzsäure angesäuert und dreifach mit je 200 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 7.51 g (37.0 mmol, 76%) *N*-Boc- γ -Aminobuttersäure als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 6.81 (t, 1H, 3J = 5.5 Hz, NH), 2.90 (q, 3J = 5.0 Hz, 4-CH₂), 2.19 (t, 2H, 4J = 7.5 Hz, 2-CH₂), 1.58 (quint., 2H, 3J = 7.2 Hz, 3-CH₂), 1.37 (s, 9H, (CH₃)₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 174.2 (C-1), 155.6 (CO_{Boc}), 77.4 (C_{q,Boc}), 31.0 (C-2), 28.2 (CH₃)₃, 24.9 (C-3) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₉H₁₇NO₄Na (MNa⁺) ber.: 226.1050; gef.: 226.1050.

9.5.6.2 Synthese von GABA-OMe·HCl



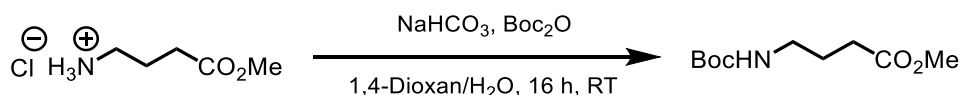
7.0 mL (7.70 g, 98.1 mmol, 2.0 eq) Acetylchlorid wurden unter Eiskühlung zu 40 mL Methanol getropft. Die Lösung wurde für 30 Minuten bei 0 °C gerührt, bevor 5.00 g (48.5 mmol, 1.0 eq) γ -Aminobuttersäure hinzugefügt wurden. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand *in vacuo* getrocknet. Es wurden 7.43 g (48.5 mmol, quant.) γ -Aminobuttersäuremethylester Hydrochlorid als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 8.23 (bs, 3H, NH_3^+), 3.58 (s, 3H, OCH_3), 2.82-2.71 (m, 2H, 4- CH_2), 2.43 (t, 2H, 3J = 7.5 Hz, 2- CH_2), 1.81 (quint., 2H, 3J = 7.5 Hz, 3- CH_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 172.7 (CO_2Me), 51.4 (OCH_3), 38.0 (C-4), 30.3 (C-2), 22.4 (C-3) ppm.

HRMS: (ESI^+ , MeOH) für $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2^+$ (MH^+) ber.: 118.0863; gef.: 118.0861.

9.5.6.3 Synthese von Boc-GABA-OMe



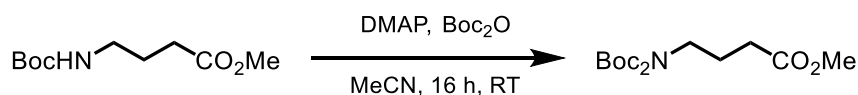
7.45 g (48.5 mmol, 1.0 eq) γ -Aminobuttersäuremethylester Hydrochlorid wurden in 80 mL 1,4-Dioxan/Wasser (1:1) gelöst und mit 30 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt. Nach Zugabe von 11.0 g (50.6 mmol, 1.1 eq) Boc-Anhydrid wurde die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Mit 1 M Salzsäure wurde der pH Wert = 2 eingestellt und anschließend wurde dreifach mit je 200 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 6.18 g (28.4 mmol, 59%) Boc- γ -Aminobuttersäuremethylester als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 6.80 (bs, 1H, NH), 3.58 (s, 3H, OCH₃), 2.95-2.89 (m, 2H, 4-CH₂), 2.28 (t, 2H, 3J = 7.5 Hz, 2-CH₂), 1.62 (quint., 2H, 3J = 7.5 Hz, 3-CH₂), 1.37 (s, 9H, (CH₃)₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 173.0 (CO₂Me), 155.5 (CO_{Boc}) 77.4 (C_{q,Boc}) 51.4 (OCH₃), 39.1 (C-4), 30.6 (C-2), 28.2 ((CH₃)₃) 22.4 (C-3) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₀H₁₉NO₄⁺ (MH⁺) ber.: 218.1387; gef.: 218.1387.

9.5.6.4 Synthese von Boc₂-GABA-OMe



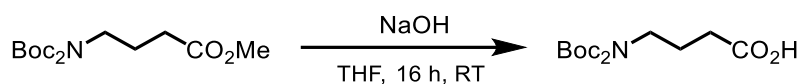
5.40 g (24.9 mmol, 1.0 eq) Boc-GABA-OMe und 0.91 g (7.45 mmol, 30 mol%) 4-(Dimethylamino)pyridin wurden in 150 mL Acetonitril vorgelegt und mit 8.20 g (37.6 mmol, 1.5 eq) Boc-Anhydrid versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH/EtOAc 4:1, R_f = 0.48). Es wurden 7.64 g (24.1 mmol, 97 %) Boc₂-GABA-OMe als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 3.58 (s, 3H, OCH₃), 3.50 (t, 2H, 3J = 7.0 Hz, 4-CH₂), 2.29 (t, 2H, 3J = 7.5 Hz, 2-CH₂), 1.74 (quint., 2H, 3J = 7.1 Hz, 3-CH₂), 1.44 (s, 18H, (CH₃)₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 172.6 (CO₂Me), 152.0 (CO_{Boc}) 81.6 (C_{q,Boc}) 51.2 (OCH₃), 45.0 (C-4), 30.4 (C-2), 27.5 ((CH₃)₃) 23.7 (C-3) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₅H₂₇NO₆Na⁺ (MNa⁺) ber.: 340.1731; gef.: 340.1733.

9.5.6.5 Synthese von Boc₂-GABA-OH



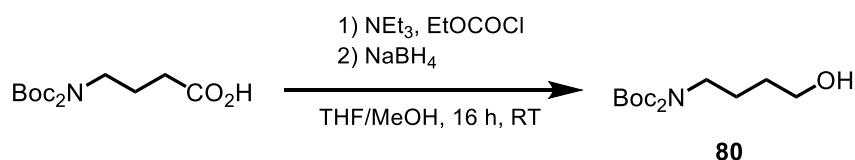
4.00 g (12.6 mmol, 1.0 eq) Boc₂-GABA-OMe wurden in 25 mL Tetrahydrofuran gelöst und mit 25 mL einer 1 M Natronlauge versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 1 M Salzsäure auf einen pH Wert von 2 gebracht. Die wässrige Phase wurde dreifach mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde *in vacuo* getrocknet. Es wurden 3.82 g (12.6 mmol, quant.) Boc₂-GABA-OH als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 3.50 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, 4-CH₂), 2.19 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, 2-CH₂), 1.75-1.68 (m, 2H, 3-CH₂), 1.44 (s, 18H, (CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 174.0 (CO₂H), 152.0 (CO_{Boc}), 81.6 (C_{q,Boc}), 45.1 (C-4), 30.7 (C-2), 27.5 ((CH₃)₃), 23.9 (C-3) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₄H₂₅NO₆Na⁺ (MNa⁺) ber.: 326.1574; gef.: 326.1574.

9.5.6.6 Synthese von Boc₂-4-Amino-1-butanol



1.66 g (5.47 mmol, 1.0 eq) Boc₂-GABA-OH wurden in 25 mL Tetrahydrofuran vorgelegt und mit 758 µL (0.55 g, 5.47 mmol, 1.0 eq) Triethylamin versetzt. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt und 521 µL (0.59 g, 5.47 mmol, 1.0 eq) Chlorameisensäureethylester hinzuge tropft. Es wurde für eine Stunde unter Eiskühlung gerührt, bevor eine Lösung von 0.62 g (16.4 mmol, 3.0 eq) Natriumborhydrid in 30 mL Methanol hinzugefügt wurde. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 50 mL Wasser verdünnt. Es wurde dreifach mit je 100 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch

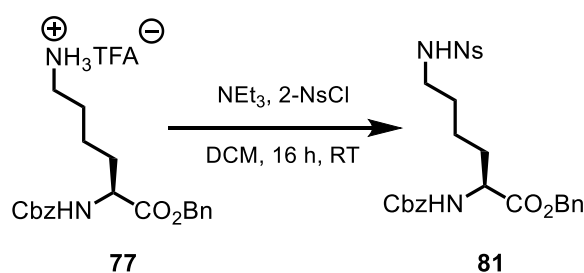
aufgereinigt (CH/EtOAc 2:1 zu 1:1, $R_f = 0.24$ (2:1)). Es wurden 1.01 g (3.49 mmol, 64%) Boc₂-4-Amino-1-butanol **80** als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 4.40 (bs, 1H, OH), 3.46 (t, 2H, $^3J = 7.2$ Hz, 4-CH₂), 3.37 (t, 2H, $^3J = 6.5$ Hz, 1-CH₂), 1.52-1.47 (m, 2H, 2-CH₂), 1.44 (s, 18H, (CH₃)₃), 1.39-1.22 (m, 2H, 3-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 152.2 (CO_{Boc}) 81.6 (C_{q,Boc}), 60.4 (C-1) 45.8 (C-4), 29.7 (C-2), 27.6 ((CH₃)₃) 25.3 (C-3) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₄H₂₇NO₅Na⁺ (MNa⁺) ber.: 312.1781; gef.: 312.1783.

9.5.6.7 Synthese von Cbz-L-Lys(Ns)-OBn



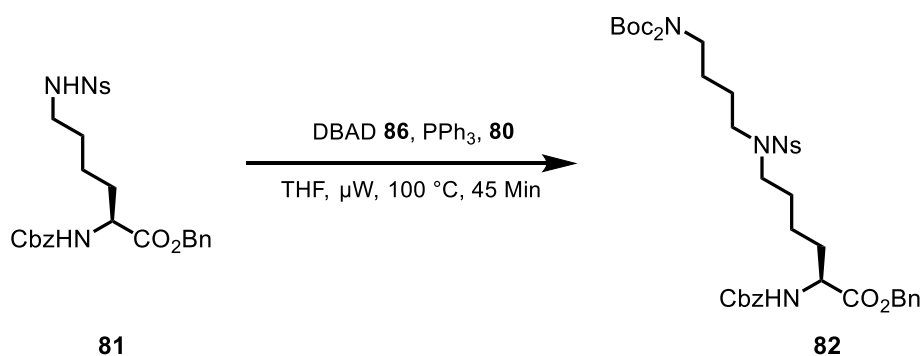
1.76 g (3.64 mmol, 1.0 eq) Cbz-L-Lys-OBn TFA **71** wurden in 35 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 1.2 mL (10.9 mmol, 3.0 eq) Triethylamin versetzt. 0.80 g (3.64 mmol, 1.0 eq) 2-Nitrobenzoylsulfonylchlorid wurden in 30 mL Dichlormethan gelöst und zur Aminosäure-Lösung getropft. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit 200 mL Dichlormethan verdünnt und die organische Phase wurde zweifach mit je 200 mL 1 M Salzsäure und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 0.92 g (1.67 mmol, 46%) Cbz-L-Lys(2-Ns)-OBn **81** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 8.14-7.68 (m, 6H, Ns, α -NH, ϵ -NH), 7.38-7.30 (m, 10H, Ph), 5.16 (s, 2H, Ph-CH₂), 5.12 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.02-3.98 (m, 1H, α -CH), 2.84 (m, 2H, ϵ -CH₂), 1.71-1.47 (m, 2H, β -CH₂), 1.46-1.33 (m, 2H, δ -CH₂), 1.33-1.22 (m, 2H, γ -CH₂) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 172.3 (CO_2R), 170.4 (C-2_{Ns}), 156.2 (CO_{Cbz}), 147.8 (C-1_{Ns}), 136.9 ($\text{C}_{\text{q,Ph}}$), 136.0 ($\text{C}_{\text{q,Ph}}$), 134.0 (CH_{Ns}), 132.6 (CH_{Ns}), 129.4 (CH_{Ns}), 128.5 (CH_{Ph}), 127.8 (CH_{Ph}), 124.4 (CH_{Ns}), 65.9 (Ph-CH_2), 65.6 (Ph-CH_2), 54.0 ($\alpha\text{-C}$), 42.5 ($\epsilon\text{-CH}_2$), 30.2 ($\beta\text{-CH}_2$), 28.7 ($\delta\text{-CH}_2$), 22.5 ($\gamma\text{-CH}_2$) ppm.

HRMS: (ESI^+ , MeOH) für $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_8\text{SNa}^+$ (MNa^+) ber.: 578.1573; gef.: 578.1583.

9.5.6.8 Synthese von Cbz-L-Dhu(Ns, Boc₂)-OBn



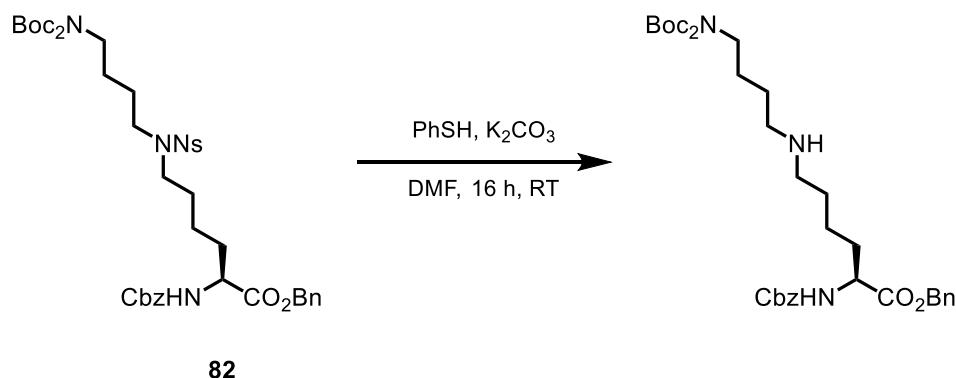
0.25 g (0.45 mmol, 1.0 eq) Cbz-L-Lys(Ns)-OBn **81**, 0.15 g (0.50 mmol, 1.1 eq) Boc₂-Aminobutanol **80**, 0.31 g (0.50 mmol, 1.1 eq) Triphenylphosphin und 0.12 g (0.50 mmol, 1.1 eq) DBAD **86** wurden in 4.0 mL absolutem THF vorgelegt und für 45 Minuten in der Mikrowelle (100 °C, P_{max}) gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Pentan/EtOAc 4:1 zu 2:1, R_f = 0.08 (4:1)). Es wurden 0.33 g (0.39 mmol, 86%) des Desoxyhypusin-Derivats **82** als gelbliches Öl erhalten.

^1H -NMR (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 7.79-7.72 (m, 2H, CH_{Ns}), 7.79-7.77 (m, 2H, CH_{Ns}), 7.74 (d, 3J = 7.6 Hz, 1H, $\alpha\text{-NH}$), 7.35-7.30 (m, 10H, Ph), 5.18-5.00 (m, 4H, 2x Ph- CH_2), 4.10-4.03 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 3.42 (brs, 2H, $\iota\text{-CH}_2$), 3.22-3.12 (m, 4H, $\zeta\text{-CH}_2$, $\epsilon\text{-CH}_2$), 1.76-1.56 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.69-1.53 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.41 (brs, 22H, 2x ((CH_3)₃, Boc), $\eta\text{-CH}_2$, $\theta\text{-CH}_2$), 1.28-1.20 (m, 4H, $\gamma\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 172.3 (CO_2Bn), 156.1 (CO_{Cbz}), 152.1 (2x CO_{Boc}), 147.5 (C-1_{Ns}), 136.9 ($\text{C}_{\text{q,Ph}}$), 135.9 ($\text{C}_{\text{q,Ph}}$), 134.4 ($\text{C}_{\text{q,Ns}}$), 133.9 (CH_{Ns}), 132.5 (CH_{Ns}), 132.2 (CH_{Ns}), 131.8 (CH_{Ns}), 129.6 (CH_{Ns}), 128.4 (CH_{Ph}), 127.8 (CH_{Ph}), 124.3 (CH_{Ph}), 81.6 (2x $\text{C}_{\text{q,Boc}}$), 65.8 (Ph-CH_2), 65.5 (Ph-CH_2), 53.8 ($\alpha\text{-CH}$), 47.1 ($\zeta\text{-CH}_2$), 47.1 ($\epsilon\text{-CH}_2$), 45.2 ($\iota\text{-CH}_2$), 30.1 ($\beta\text{-CH}_2$), 27.5 ((CH_3)₃, Boc), 27.5 ($\delta\text{-CH}_2$), 25.6 ($\theta\text{-CH}_2$), 25.2 ($\eta\text{-CH}_2$), 22.5 ($\gamma\text{-CH}_2$) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₄₁H₅₄N₄O₁₂SN⁺ (MNa⁺) ber.: 849.3351; gef.: 849.3361.

9.5.6.9 Synthese von Cbz-L-Dhu(NH, Boc₂)-OBn



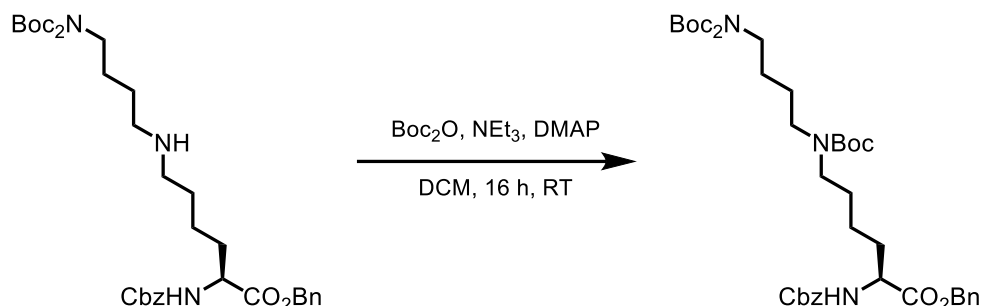
0.29 g (0.35 mmol, 1.0 eq) des Desoxyhypusins **82** wurden in 4.0 mL DMF gelöst und mit 0.15 g (1.05 mmol, 3.0 eq) Kaliumcarbonat und 41 µL (44.2 mg, 0.40 mmol, 1.2 eq) Thiophenol versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH/EtOAc 2:1 zu 1:1 mit 10% NEt₃, R_f = 0.24 (1:1:0.1)). Es wurden 0.19 g (0.30 mmol, 83%) des Desoxyhypusin-Derivats als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 7.75 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H, α-NH), 7.35-7.32 (m, 10H, Ph), 6.75 (t, ³J = 5.4 Hz, 1H, ε-NH), 5.18-4.99 (m, 4H, 2x Ph-CH₂), 4.09-3.99 (m, 1H, α-CH), 3.45 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, ι-CH₂), 2.46-2.37 (m, 4H, ζ-CH₂, ε-CH₂), 1.76-1.56 (m, 2H, β-CH₂), 1.43 (brs, 20H, 2x ((CH₃)₃, Boc), θ-CH₂), 1.32-1.20 (m, 6H, η-CH₂, γ-CH₂, δ-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 172.3 (CO₂Bn), 156.1 (CO_{Cbz}), 152.1 (2x CO_{Boc}), 137.7 (C_q, Ph), 135.8 (C_q, Ph), 128.3 (CH_{Ph}), 128.0 (CH_{Ph}), 124.3 (CH_{Ph}), 127.7 (CH_{Ph}), 127.6 (CH_{Ph}), 81.5 (2x C_q, Boc), 65.8 (Ph-CH₂), 65.4 (Ph-CH₂), 54.0 (α-CH), 48.9 (ζ-CH₂), 48.5 (ε-CH₂), 45.7 (ι-CH₂), 28.9 (β-CH₂), 27.6 ((CH₃)₃, Boc), 26.6 (δ-CH₂), 26.4 (θ-CH₂), 25.8 (η-CH₂), 23.2 (γ-CH₂) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₃₅H₅₂N₃O₈⁺ (MH⁺) ber.: 642.3748; gef.: 642.3761.

9.5.6.10 Synthese von Cbz-L-Dhu(Boc, Boc₂)-OBn

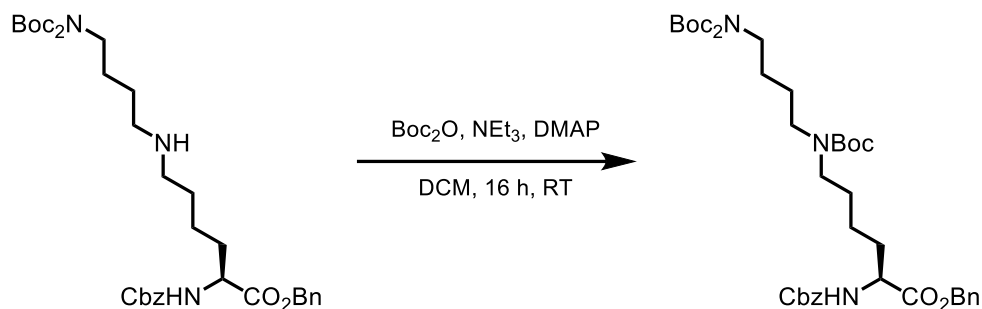


0.30 g (0.47 mmol, 1.0 eq) des Desoxyhypusins wurden in 8.0 mL DCM gelöst und mit 6.0 mg (0.05 mmol, 0.1 eq) DMAP und 131 μL (0.22 g, 0.94 mmol, 2.0 eq) Triethylamin versetzt. Nach Abkühlen der Lösung auf 0 °C wurden 0.16 g (0.71 mmol, 1.5 eq) Boc-Anhydrid hinzugegeben, die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH/EtOAc 5:1, $R_f = 0.25$). Es wurden 0.32 g, 0.43 mmol, 77%) als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): $\delta = 7.73$ (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, α -NH), 7.35-7.34 (m, 10H, Ph), 5.17-4.99 (m, 4H, 2x Ph-CH₂), 4.10-4.03 (m, 1H, α -CH), 3.46-3.44 (m, 2H, ι -CH₂), 3.07-3.05 (m, 4H, ζ -CH₂, ϵ -CH₂), 1.73-1.56 (m, 2H, β -CH₂), 1.44-1.40 (brs, 22H, 2x ((CH₃)₃, Boc), θ -CH₂ β -CH₂), 1.32-1.20 (m, 6H, η -CH₂, γ -CH₂, δ -CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): $\delta = 172.3$ (CO₂Bn), 156.1 (CO_{Cbz}), 154.4 (2x CO_{Boc}), 152.1 (CO_{Boc}), 137.5 (C_q, Ph), 135.5 (C_q, Ph), 128.3 (CH_{Ph}), 128.1 (CH_{Ph}), 124.3 (CH_{Ph}), 127.7 (CH_{Ph}), 127.6 (CH_{Ph}), 81.5 (2x C_q, Boc), 78.1 (C_q, Boc), 65.8 (Ph-CH₂), 65.4 (Ph-CH₂), 53.9 (α -CH), 46.1 (ζ -CH₂), 45.5 (ϵ -CH₂), 45.7 (ι -CH₂), 30.3 (β -CH₂), 27.8 ((CH₃)₃, Boc), δ -CH₂ 27.5 ((CH₃)₃, Boc), 26.6 () 26.4 (θ -CH₂), 25.9 (η -CH₂), 22.7 (γ -CH₂) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₄₀H₅₉N₃O₁₀Na⁺ (MNa⁺) ber.: 746.4093; gef.: 746.4101.

9.5.6.11 Synthese von Cbz-L-Dhu(Boc, Boc₂)-OBn

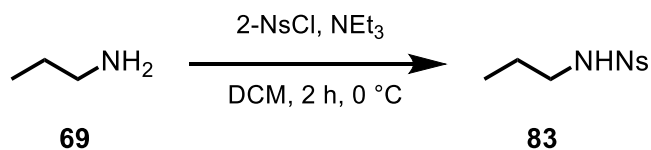
0.30 g (0.47 mmol, 1.0 eq) des Desoxyhypusins wurden in 8.0 mL DCM gelöst und mit 6.0 mg (0.05 mmol, 0.1 eq) DMAP und 131 μL (0.22 g, 0.94 mmol, 2.0 eq) Triethylamin versetzt. Nach Abkühlen der Lösung auf 0 °C wurden 0.16 g (0.71 mmol, 1.5 eq) Boc-Anhydrid hinzugegeben, die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH/EtOAc 5:1, $R_f = 0.25$). Es wurden 0.32 g, 0.43 mmol, 77%) als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): $\delta = 7.73$ (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, α -NH), 7.35-7.34 (m, 10H, Ph), 5.17-4.99 (m, 4H, 2x Ph-CH₂), 4.10-4.03 (m, 1H, α -CH), 3.46-3.44 (m, 2H, ι -CH₂), 3.07-3.05 (m, 4H, ζ -CH₂, ϵ -CH₂), 1.73-1.56 (m, 2H, β -CH₂), 1.44-1.40 (brs, 22H, 2x ((CH₃)₃, Boc), θ -CH₂ β -CH₂), 1.32-1.20 (m, 6H, η -CH₂, γ -CH₂, δ -CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): $\delta = 172.3$ (CO₂Bn), 156.1 (CO_{Cbz}), 154.4 (2x CO_{Boc}), 152.1 (CO_{Boc}), 137.5 (C_q, Ph), 135.5 (C_q, Ph), 128.3 (CH_{Ph}), 128.1 (CH_{Ph}), 124.3 (CH_{Ph}), 127.7 (CH_{Ph}), 127.6 (CH_{Ph}), 81.5 (2x C_q, Boc), 78.1 (C_q, Boc), 65.8 (Ph-CH₂), 65.4 (Ph-CH₂), 53.9 (α -CH), 46.1 (ζ -CH₂), 45.5 (ϵ -CH₂), 45.7 (ι -CH₂), 30.3 (β -CH₂), 27.8 ((CH₃)₃, Boc, δ -CH₂), 27.5 ((CH₃)₃, Boc), 26.6 (θ -CH₂), 26.4 (θ -CH₂), 25.9 (η -CH₂), 22.7 (γ -CH₂) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₄₀H₅₉N₃O₁₀Na⁺ (MNa⁺) ber.: 746.4093; gef.: 746.4101.

9.5.6.12 Synthese von *N*-Propyl-(2'-Nitrobenzyl)-sulfonylamid



4.50 g (20.3 mmol, 1.2 eq) 2-NsCl wurden bei 0 °C in 20 mL Dichlormethan vorgelegt und eine Lösung aus 1.40 mL (1.00 g, 16.9 mmol, 1.0 eq) *n*-Propylamin **69** und 2.80 mL (20.3 mmol, 1.2 eq) Triethylamin in 10 mL Dichlormethan wurde tropfenweise hinzugefügt. Die Lösung wurde zwei Stunden bei 0 °C gerührt, bevor die organische Phase zweifach mit je 30 mL Wasser, 15 mL 10% Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 15 mL 1 M Salzsäure und 30 mL gesättigte Natriumchlorid-Lösung gewaschen wurde. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde *in vacuo* getrocknet. Es wurden 3.73 g (15.3 mmol, 83%) *N*-Propyl-(2'-Nitrobenzyl)-sulfonylamid **83** als brauner Feststoff erhalten.

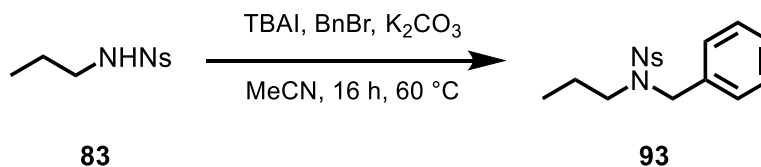
¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 8.06 (t, 1H, ³*J* = 5.7 Hz, NH), 8.02-7.97 (m, 3H, 3'-CH), 7.96-7.93 (m, 1H, 6'-CH), 7.88-7.82 (m, 2H, 4'-CH, 5'-CH), 2.84 (q, 2H, ³*J* = 7.2 Hz, 1-CH₂), 1.41 (sext, 2H, ³*J* = 7.2 Hz, 2-CH₂), 0.79 (t, ³*J* = 7.4 Hz, 3-CH₃) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 147.7 (C-2'), 133.9 (C-5'), 132.9 (C-1'), 132.5 (C-4'), 129.4 (C-3'), 124.2 (C-6'), 44.4 (C-1), 22.5 (C-2), 11.0 (C-3) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₉H₁₂N₂O₄SN_a (MNa⁺) ber.: 267.0410; gef.: 267.0410.

9.5.7. Synthesen der Maltosin-Derivate

9.5.7.1 Synthese von *N*-Benzyl-*N*-Propyl-(2'-Nitrobenzyl)-sulfonylamid



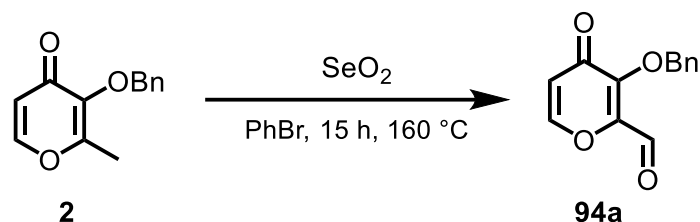
0.50 g (2.05 mmol, 1.0 eq) *N*-Propyl-(2'-Nitrobenzyl)-sulfonylamid **83** wurden in 15 mL Acetonitril gelöst und mit 1.28 g (9.23 mmol, 4.5 eq) Kaliumcarbonat versetzt. Es wurden 20.0 mg (0.05 mmol, 3mol%) Tetrabutylammoniumiodid und 330 μL (0.47 g, 2.67 mmol, 1.3 eq) Benzylbromid hinzugefügt und die Lösung wurde für 16 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel des Filtrats wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Pentan:EtOAc 5:1, $R_f = 0.14$). Es wurden 0.31 g (0.93 mmol, 45%) *N*-Benzyl-*N*-Propyl-(2'-Nitrobenzyl)-sulfonylamid **93** als gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO-d_6): $\delta = 8.06$ (dd, 1H, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 3'-CH), 8.00 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 6'-CH), 7.90 (dt, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 4'-CH), 7.83 (dt, $^3J = 7.8$ Hz, $^3J = 1.3$ Hz, 5'-CH), 7.37-7.26 (m, 5H, Ph), 4.50 (s, 2H, Ph-CH₂), 3.14 (t, 2H, $^3J = 7.6$ Hz, 1-CH₂), 1.30 (sext, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, 2-CH₂), 0.63 (t, 3H, $^3J = 7.5$ Hz, 3-CH₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO-d_6): $\delta = 147.4$ (C-2'), 136.3 (C_{q,Ph}), 134.4 (C-4'), 132.4 (C-5'), 131.9 (C-1'), 129.8 (C-3'), 128.4 (CH_{Ph}), 127.8 (CH_{Ph}), 127.6 (CH_{Ph}), 124.4 (C-6'), 50.6 (Ph-CH₂), 48.9 (C-1), 20.6 (C-2), 10.6 (C-3) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₆H₁₈N₂O₄SN⁺ (MNa⁺) ber.: 357.0881; gef.: 357.0879.

9.5.7.2 Synthese von 3-(Benzyloxy)-4-oxopyran-2-carbaldehyd



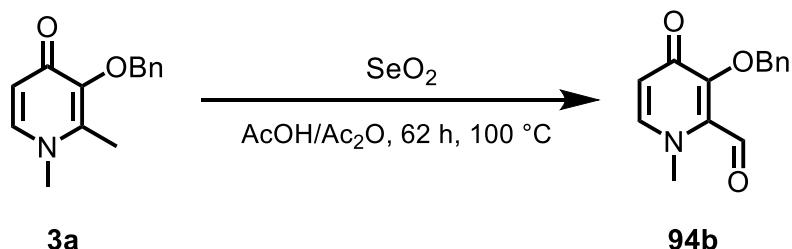
2.00 g (9.28 mmol, 1.0 eq) Benzyl-Maltol **2** wurden in 15 mL Brombenzol gelöst und mit 3.08 g (27.8 mmol, 3.0 eq) Selendioxid versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei 160 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc:CH 3:1, R_f = 0.64). Es wurden 0.94 g (4.08 mmol, 44%) 3-(Benzyloxy)-4-oxopyran-2-carbaldehyd **94a** als oranges Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 9.83 (s, 1H, CHO), 8.23 (d, 1H, 3J = 5.6 Hz, 6-CH), 7.45-7.31 (m, 5H, Ph), 6.60 (d, 1H, 3J = 6.6 Hz, 5-CH), 5.34 (s, 2H, Ph-CH₂) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 183.1 (CHO), 176.2 (C-4), 155.7 (C-6), 151.0 (C-3), 149.2 (C-2), 135.5 (C_q, Ph), 129.0 (CH_{Ph}), 128.6 (CH_{Ph}), 128.5 (CH_{Ph}), 117.5 (C-5), 74.1 (Ph-CH₂) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₃H₁₀O₄Na⁺ (MNa⁺) ber.: 253.0481; gef.: 253.0471.

9.5.7.3 Synthese von 3-Benzyloxy-1-Methyl-4-Oxo-1,4-Dihydropyridine-2-carbaldehyd



1.50 g (6.54 mmol, 1.0 eq) Benzyl-Deferipron **3a** und 2.17 g (19.6 mmol, 3.0 eq) Selendioxid wurden in 32 mL AcOH/Ac₂O (1:1) und für 62 h bei 100 °C gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat unter vermindertem Druck eingengt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM:MeOH 5:1, R_f = 0.26). Es wurden

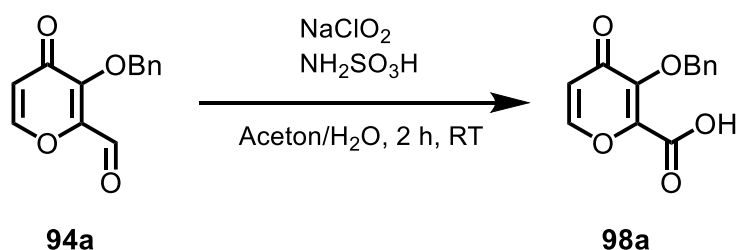
0.45 g (1.85 mmol, 28%) 3-Benzyloxy-1-Methyl-4-Oxo-1,4-Dihydropyridine-2-carbaldehyd **94b** als gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 8.20 (s, 1H, CHO), 7.69 (d, 1H, 3J = 7.6 Hz, 6-CH), 7.43-7.30 (m, 5H, Ph), 6.26 (d, 1H, 3J = 7.6 Hz, 5-CH), 5.15 (s, 2H, Ph-CH₂), 3.81 (s, 3H, NCH₃) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 182.5 (CHO), 172.2 (C-4), 146.4 (C-3), 142.5 (C-6), 136.9 (C_{q,Ph}), 128.5 (CH_{Ph}), 128.2 (CH_{Ph}), 128.0 (CH_{Ph}), 116.5 (C-5), 72.0 (Ph-CH₂), 41.7 (NCH₃) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₄H₁₄NO₃⁺ (MH⁺) ber.: 244.0975; gef.: 244.0968.

9.5.7.4 Synthese von 3-(Benzyloxy)-4-oxopyran-2-carbonsäure



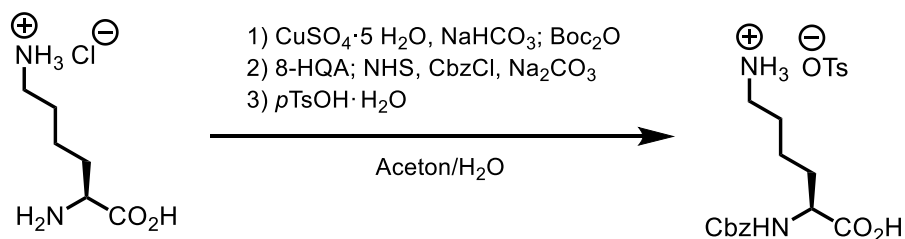
0.27 g (1.17 mmol, 1.0 eq) 3-(Benzyloxy)-4-oxopyran-2-carbaldehyd **94a** wurden in 4 mL Aceton/Wasser (1:1) gelöst und mit 0.18 g (1.76 mmol, 1.5 eq) Amidosulfonsäure, sowie 0.18 g (1.40 mmol, 1.2 eq) Natriumchlorit versetzt. Die Lösung wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Phase wurde zentrifugiert, der erhaltene Niederschlag mittels Filtration abgetrennt und *in vacuo* getrocknet. Es wurden 0.22 g (0.90 mmol, 77%) 3-(Benzyloxy)-4-oxopyran-2-carbonsäure **98a** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 8.18 (d, 1H, 3J = 5.8 Hz, 6-CH), 7.47-7.29 (m, 5H, Ph), 6.52 (d, 1H, 3J = 5.8 Hz, 5-CH), 5.09 (s, 2H, Ph-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 175.4 (C-4), 160.7 (CO₂H), 155.5 (C-6), 148.0 (C-2), 147.0 (C-3), 136.6 (C_{q,Ph}), 128.2 (CH_{Ph}), 128.1 (CH_{Ph}), 128.0 (CH_{Ph}), 116.9 (C-5), 73.5 (Ph-CH₂) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₃H₁₀O₅Na⁺ (MNa⁺) ber.: 269.0421; gef.: 269.0420.

9.5.7.5 Synthese von Cbz-L-Lys-OH·TsOH



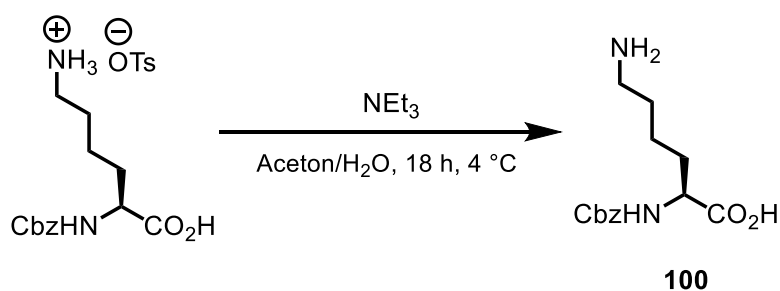
50.0 g (274 mmol, 2.0 eq) H-L-Lys-OH·HCl wurden in 275 mL 2 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst und eine Lösung bestehend aus 34.3 g (137 mmol, 1.0 eq) Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat und 23.0 g (274 mmol, 2.0 eq) Natriumhydrogencarbonat in 275 mL Wasser wurde hinzugefügt. Die Lösung wurde 15 Minuten gerührt, bevor 80.8 g (356 mmol, 2.6 eq) Boc-Anhydrid gelöst in 330 mL Aceton hinzugefügt wurden. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und 70 mL Methanol wurden anschließend hinzugefügt. Der erhaltene, violette Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem Aceton gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Es wurden 71.8 g (130 mmol, 95%) [Lys(Boc)]₂Cu als violetter Feststoff erhalten. 8.58 g (15.5 mmol, 1.0 eq) [Lys(Boc)]₂Cu wurden ohne weitere Aufreinigung in 30 mL Aceton gelöst und mit 60 mL 10% Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. 4.63 g (31.9 mmol, 2.1 eq) 8-Hydroxychinolin wurden hinzugegeben und die Lösung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. 3.92 g (34.1 mmol, 2.2 eq) N-Hydroxysuccinimid wurden 20 mL Wasser gelöst und es wurden 1.81 g (17.0 mmol, 1.0 eq) Natriumcarbonat, sowie 15 mL Aceton dazugegeben. 4.4 mL (31.0 mmol, 2.0 eq) Benzylchloroformiat wurden langsam zu dieser hinzutropft und die Lösung wurde für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Benzylchloroformiat-Lösung wurde anschließend zur Aminosäure-Lösung gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der erhaltene grüne Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem H₂O gewaschen. Das Filtrat wurde mit 1 M Salzsäure angesäuert und die wässrige Phase wurde anschließend vierfach mit je 120 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde in 80 mL Aceton gelöst und mit 5.89 g (31.0 mmol, 2.0 eq) *para*-Toluolsulfonsäure-Hydrat versetzt. Diese Lösung wurde über Nacht bei 4 °C gerührt. Der entstandene, farblose Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem Aceton gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Es wurden 6.29 g (13.9 mmol, 90%) Cbz-L-Lys-OH·OTs als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 7.62 (bs, 3H, $\epsilon\text{-NH}_3^+$), 7.56 (d, 1H, 3J = 8.0 Hz, $\alpha\text{-NH}$), 7.48 (d, 2H, 3J = 8.1 Hz, Ts-2-CH, Ts-6-CH), 7.39-7.28 (m, 5H, Ph), 7.11 (d, 2H, 3J = 8.1 Hz, Ts-3-CH, Ts-5-CH), 5.08-4.98 (m, 2H, Ph-CH₂), 3.92 (dt, 3J = 8.0 Hz, 3J = 4.6 Hz), 2.75 (sext, 2H, 3J = 6.9 Hz, $\epsilon\text{-CH}_2$), 2.28 (s, 3H, Ts-CH₃), 1.73-1.54 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.54-1.44 (m, 2H, $\delta\text{-CH}_2$), 1.42-1.29 (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 173.8 (CO₂H), 156.1 (CO_{Cbz}), 145.5 (Ts-C-1), 137.6 (Ts-C-4), 136.9 (C_{q,Ph}), 128.3 (C_{Ph}), 128.0 (Ts-C-3, Ts-C-5), 127.8 (C_{Ph}), 127.7 (C_{Ph}), 125.4 (Ts-C-2, Ts-C-6), 65.3 (Ph-CH₂), 53.5 ($\alpha\text{-C}$), 38.5 ($\epsilon\text{-C}$), 30.1 ($\beta\text{-C}$), 26.4 ($\delta\text{-C}$), 22.4 ($\gamma\text{-C}$), 20.7 (Ts-CH₃) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₂₁H₂₈N₂O₇SNa⁺ (MNa⁺) ber.: 475.1512; gef.: 175.1509.

9.5.7.6 Synthese von Cbz-L-Lys-OH



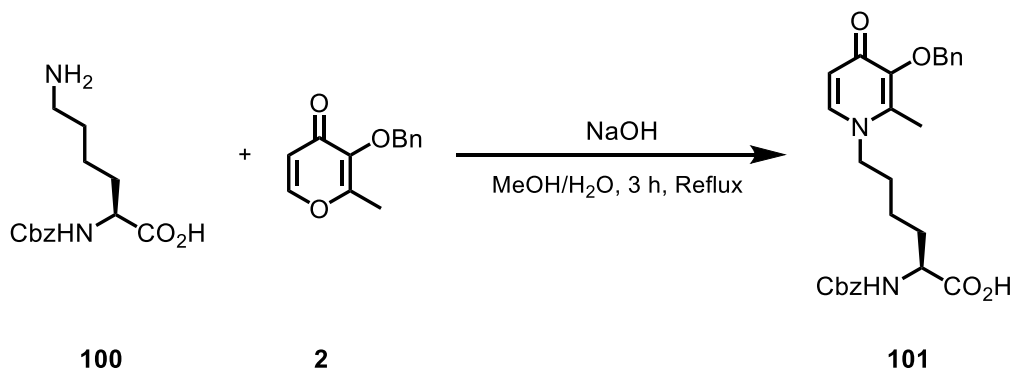
6.29 g (13.9 mmol, 1.0 eq) Cbz-L-Lys-OH·TsOH wurden in 10 mL Aceton/Wasser (3:2) gelöst und mit 2.60 mL (18.7 mmol, 2.6 eq) Triethylamin versetzt. Nach 30 Minuten wurden 50 mL Aceton hinzugefügt und die Lösung wurde über Nacht bei 4 °C gerührt. Der erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem Aceton gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Es wurden 3.65 g (13.0 mmol, 94%) Cbz-L-Lys-OH **100** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 7.55 (d, 1H, 3J = 8.0 Hz, $\alpha\text{-NH}$), 7.39-7.27 (m, 5H, Ph), 5.08-4.98 (m, 2H, Ph-CH₂), 3.92 (dt, 3J = 8.0 Hz, 3J = 4.6 Hz, $\alpha\text{-CH}$), 2.75 (pent, 2H, 3J = 6.2 Hz, $\epsilon\text{-CH}_2$), 1.74-1.55 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.55-1.45 (m, 2H, $\delta\text{-CH}_2$), 1.42-1.30 (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 173.8 (CO₂H), 156.2 (CO_{Cbz}), 136.9 (C_{q,Ph}), 128.3 (C_{Ph}), 127.8 (C_{Ph}), 127.7 (C_{Ph}), 125.4 (Ts-C-2, Ts-C-6), 65.4 (Ph-CH₂), 53.6 ($\alpha\text{-C}$), 38.6 ($\epsilon\text{-C}$), 30.1 ($\beta\text{-C}$), 26.4 ($\delta\text{-C}$), 22.5 ($\gamma\text{-C}$) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₄H₂₁N₂O₄ (MH⁺) ber.: 281.1497; gef.: 281.1496.

9.5.7.7 Synthese von Cbz-L-Mal(Bn)-OH



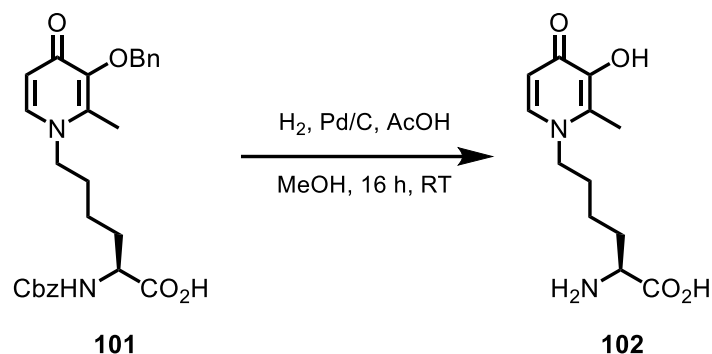
0.35 g (1.62 mmol, 1.0 eq) Benzyl-Maltol **2** und 0.50 g (1.78 mmol, 1.1 eq) Cbz-L-Lys-OH **100** wurden in 20 mL Methanol/Wasser (1:1) gelöst und mit 1.50 mL 20% NaOH_{aq} versetzt. Die Lösung wurde für drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die erhaltene wässrige Phase wurde mit 2 M Salzsäure auf pH = 2 gebracht. Die wässrige Phase wurde dreifach mit je 60 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweifach mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM:MeOH 5:1, 10% AcOH, R_f = 0.50). Es wurden 0.51 g (1.07 mmol, 66%) Cbz-L-Mal(Bn)-OH **101** als braunes Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 7.56 (d, 1H, ³J = 7.5 Hz, 6-CH), 7.51 (d, 1H, ³J = 8.0 Hz, α-NH), 7.39-7.27 (m, 10 H, Ph), 6.12 (d, 1H, ³J = 7.5 Hz, 5-CH), 5.02 (s, 2H, Ph-CH₂), 5.01 (s, 2H, Ph-CH₂), 3.91 (m, 1H, α-CH), 3.88-3.77 (m, 2H, ε-CH₂), 2.13 (s, 3H, CH₃), 1.76-1.45 (m, 2H, β-CH₂), 1.62-1.45 (m, 2H, δ-CH₂), 1.31-1.20 (m, 2H, γ-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 173.8 (CO₂H), 171.4 (C-4), 156.2 (CO_{Cbz}), 136.9 (C_{q,Ph}), 128.3 (C_{Ph}), 127.8 (C_{Ph}), 127.7 (C_{Ph}), 65.4 (Ph-CH₂), 53.6 (α-C), 38.6 (ε-C), 30.1 (β-C), 26.4 (δ-C), 22.5 (γ-C) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₂₇H₃₀N₂O₆⁺ (MH⁺) ber.: 479.2177; gef.: 479.2177.

9.5.7.8 Synthese von H-L-Mal-OH



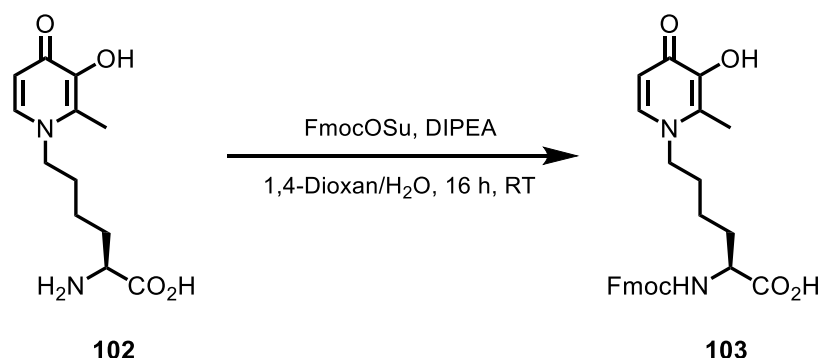
0.20 g (0.42 mmol, 1.0 eq) Cbz-L-Mal(Bn)-OH **101** wurden in 10 mL Methanol gelöst und mit 0.10 mg Pd/C (5%) versetzt, sowie 2.40 mL (4.2 mmol, 10 eq) Essigsäure versetzt. Die Lösung wurde über Nacht in einer 10 bar Wasserstoff-Atmosphäre gerührt. Die Lösung wurde zentrifugiert, dekantiert, das Filtrat mittels Spritzenfilter erneut filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Es wurden 86.2 mg (0.34 mmol, 82%) H-L-Mal-OH **102** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 7.55 (d, 1H, 3J = 7.5 Hz, 6-CH), 6.12 (d, 1H, 3J = 7.5 Hz, 5-CH), 3.89 (t, 2H, 3J = 7.3 Hz, ϵ -CH₂), 3.09 (t, 1H, 3J = 6.1 Hz, α -CH), 2.28 (s, 3H, CH₃), 1.78-1.55 (m, 2H, β -CH₂), 1.66-1.55 (m, 2H, δ -CH₂), 1.40-1.27 (m, 2H, γ -CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 169.4 (C-4), 168.7 (CO₂H), 145.3 (C-3), 137.5 (C-6), 128.3 (C-2), 110.4 (C-5), 53.9 (α -C), 52.5 (ϵ -C), 30.5 (β -C), 30.0 (δ -C), 22.0 (γ -C), 11.2 (CH₃) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₂H₁₉N₂O₄⁺ (MH⁺) ber.: 255.1342; gef.: 255.1339.

9.5.7.9 Synthese von Fmoc-L-Mal-OH

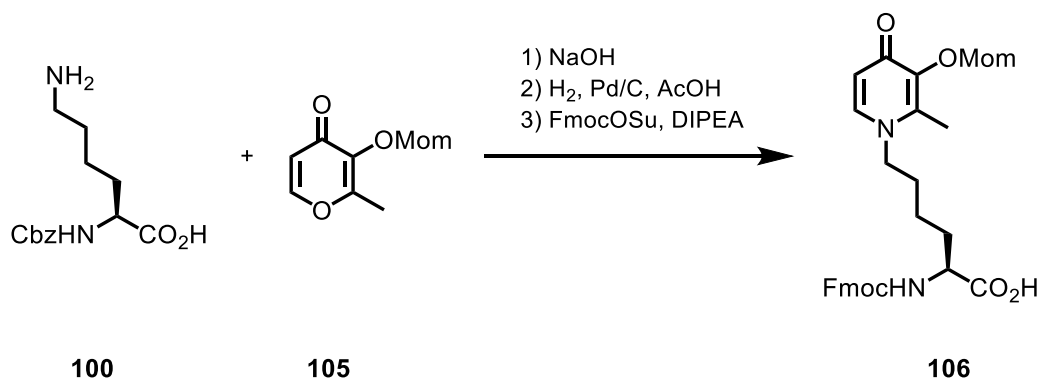


0.39 g (1.53 mmol, 1.0 eq) H-L-Mal-OH **102** wurden in 8.5 mL 1,4-Dioxan/H₂O (10:7) gelöst und mit 1.0 mL (0.91 g, 7.03 mmol, 4.6 eq) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. 0.57 g (1.68 mmol, 1.0 eq) Fmoc-OSu wurden in 2.5 mL 1,4-Dioxan gelöst und zur Lösung getropft. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurden erneut 200 μ L *N,N*-Diisopropylethylamin hinzugefügt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde mit 20 mL Wasser verdünnt. Mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung wurde der pH = 8.5 eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreifach mit je 150 mL Diethylether gewaschen und anschließend wurde mit 6 M Salzsäure auf pH = 1.5 eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreifach mit 150 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde *in vacuo* getrocknet. Es wurden 0.58 g (1.21 mmol, 79%) Fmoc-L-Mal-OH **103** als roter Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 8.15 (d, 1H 3J = 4.9 Hz, 6-CH), 7.89 (d, 2H, 3J = 7.6 Hz, CH_{Fmoc,ar.}), 7.72 (m, 2H, CH_{Fmoc,ar.}), 7.64 (d, 1H, 3J = 8.1 Hz, α -NH), 7.41 (t, 2H, 3J = 7.6 Hz, CH_{Fmoc,ar.}), 7.32 (t, 2H, 3J = 7.4 Hz, CH_{Fmoc,ar.}), 7.16 (d, 3J = 4.9 Hz, 5-CH), 4.31-4.24 (m, 2H, 9-CH₂), 4.21 (t, 3J = 6.9 Hz, 8-CH), 4.03-3.97 (m, 2H, ϵ -CH₂), 3.93 (m, 1H, α -CH), 2.33 (s, 3H, CH₃), 1.98-1.58 (m, 2H, β -CH₂), 1.70-1.58 (m, 2H, δ -CH₂), 1.41-1.28 (m, 2H, γ -CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 173.7 (CO₂H), 166.2 (C-4), 156.1 (CO_{Fmoc}), 144.8 (C-3), 143.7 (2C, C_{q,Fmoc}), 140.6 (C_{q,Fmoc}), 137.6 (C-6), 131.2 (C-2), 127.6 (2C, CH_{Fmoc,ar.}), 125.2 (2C; CH_{Fmoc,ar.}), 120.0 (CH_{Fmoc,ar.}), 110.5 (C-5), 65.5 (9-CH₂), 53.6 (α -C), 53.3 (ϵ -C), 46.6 (8-CH), 30.2 (β -C), 29.5 (δ -C), 22.4 (γ -C), 12.3 (CH₃) ppm.

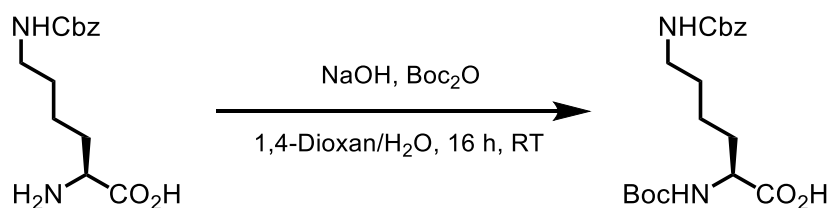
9.5.7.10 Synthese von Fmoc-L-Mal(Mom)-OH



Die Durchführung erfolgte analog zur Darstellung von Fmoc-L-Mal-OH **103**. 0.27 g (0.52 mmol, 34% über drei Stufen) Fmoc-L-Mal(Mom)-OH **106** konnten ausgehend von 0.50 g (1.70 mmol, 1.1 eq) Cbz-L-Lys-OH **100** und 0.28 g (1.62 mmol, 1.0 eq) Mom-Maltol **105** über drei Stufen erhalten werden.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 8.15 (d, 1H 3J = 4.9 Hz, 6-CH), 7.89 (d, 2H, 3J = 7.6 Hz, CH_{Fmoc,ar.}), 7.72 (m, 2H, CH_{Fmoc,ar.}), 7.64 (d, 1H, 3J = 8.1 Hz, α -NH), 7.41 (t, 2H, 3J = 7.6 Hz, CH_{Fmoc,ar.}), 7.32 (t, 2H, 3J = 7.4 Hz, CH_{Fmoc,ar.}), 7.16 (d, 3J = 4.9 Hz, 5-CH), 4.31-4.24 (m, 2H, 9-CH₂), 5.05 (s, 2H, OCH₂), 4.21 (t, 3J = 6.9 Hz, 8-CH), 4.03-3.97 (m, 2H, ϵ -CH₂), 3.93 (m, 1H, α -CH), 3.21 (s, 3H, OCH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃), 1.98-1.58 (m, 2H, β -CH₂), 1.70-1.58 (m, 2H, δ -CH₂), 1.41-1.28 (m, 2H, γ -CH₂) ppm.

9.5.7.11 Synthese von Boc-L-Lys(Cbz)-OH



2.50 g (8.92 mmol, 1.0 eq) H-L-Lys(Cbz)-OH wurden in 40 mL 1,4-Dioxan/H₂O (1:1) gelöst. Unter Eiskühlung wurden zunächst 4.50 mL 2 M NaOH-Lösung und anschließend 1.96 g (8.92 mmol, 1.0 eq) Boc₂O hinzugefügt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die erhaltene wässrige Phase wurde mit 2 M KHSO₄ auf pH = 2 gestellt. Die wässrige Phase wurde fünffach mit je 60 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der

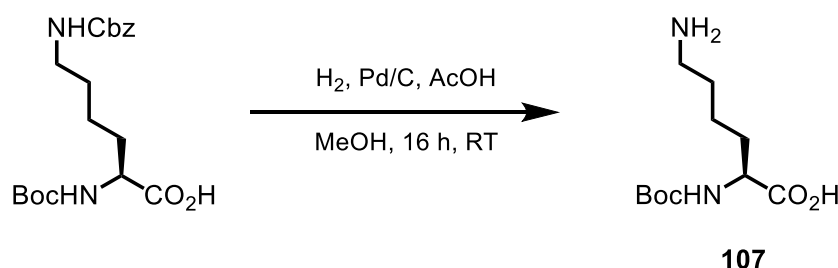
erhaltene Rückstand wurde *in vacuo* getrocknet. Es wurden 2.39 g (6.92 mmol, 71%) Boc-L-Lys(Cbz)-OH als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 7.38-7.28 (m, 5H, Ph), 7.23 (t, 1H, 3J = 5.5 Hz, ϵ -NH), 7.02 (d, 1H, 3J = 7.9 Hz, α -NH), 4.99 (s, 2H, Ph-CH₂), 3.81 (m, 1H, α -CH), 2.97 (q, 2H, 3J = 5.5 Hz, ϵ -CH₂) 1.67-1.48 (m, 2H, β -CH₂), 1.44-1.22 (m, 13H, δ -CH₂, γ -CH₂, (CH₃)₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 174.2 (CO₂H), 156.0 (CO_{Cbz}), 155.8 (CO_{Boc}), 137.2 (C_{q,Ph}), 128.3 (CH_{Ph}), 128.1 (CH_{Ph}), 127.7 (C_{Ph}), 77.9 (C_{q,Boc}), 65.1 (Ph-CH₂), 53.4 (α -C), 39.3 (ϵ -C), 30.3 (β -C), 28.9 (δ -C), 28.2 ((CH₃)₃), 22.9 (γ -C) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₉H₂₈N₂O₆Na⁺ (MNa⁺) ber.: 403.1840; gef.: 403.1840.

9.5.7.12 Synthese von Boc-L-Lys-OH



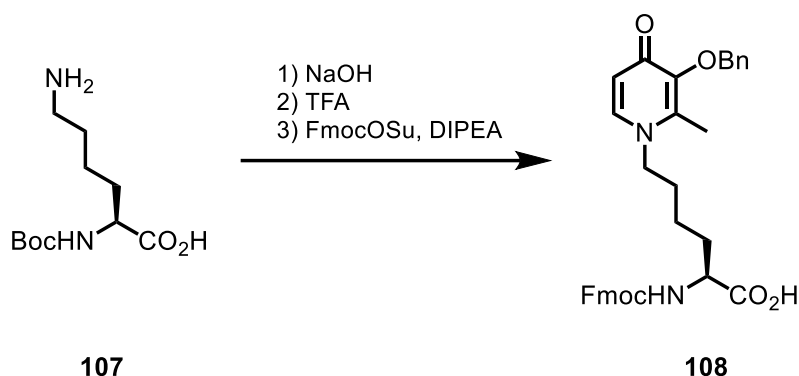
1.50 g (3.94 mmol, 1.0 eq) Boc-L-Lys(Cbz)-OH wurden in 30 mL MeOH gelöst, mit 450 μL (0.47 g, 7.89 mmol, 2.0 eq) AcOH und 100 mg Pd/C (5%) versetzt. Es wurde über Nacht in einer 10 bar H₂-Atmosphäre gerührt. Die Lösung wurde zentrifugiert, dekantiert und das Filtrat erneut mittels Spritzenfilter filtriert. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde *in vacuo* getrocknet. Es wurden 0.65 g (2.64 mmol, 67%) Boc-L-Lys-OH **107** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 7.10 (d, 1H, 3J = 6.8 Hz, α -NH), 3.62 (q, 1H, 3J = 6.8 Hz, α -CH), 2.70 (t, 2H, 3J = 7.5 Hz, ϵ -CH₂) 1.67-1.48 (m, 2H, β -CH₂, δ -CH₂), 1.39-1.18 (m, 13H, γ -CH₂, (CH₃)₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 174.3 (CO₂H), 156.8 (CO_{Boc}), 77.9 (C_{q,Boc}), 54.4 (α -C), 38.6 (ϵ -C), 31.6 (β -C), 28.1 (δ -C), 26.9 ((CH₃)₃), 21.9 (γ -C) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₁H₂₃N₂O₄⁺ (MH⁺) ber.: 247.1653; gef.: 247.1652.

9.5.7.13 Synthese von Fmoc-L-Mal(Bn)-OH

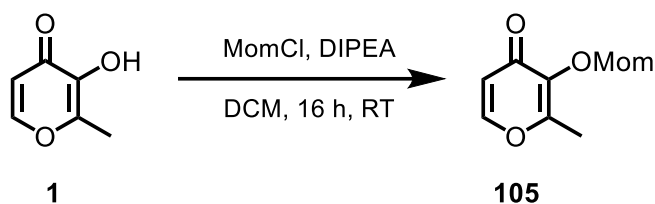


Die Durchführung erfolgte analog zur Darstellung von Fmoc-L-Mal-OH **103**. 0.31 g (0.73 mmol, 56% über drei Stufen) Fmoc-L-Mal(Bn)-OH **108** konnten ausgehend von 0.30 g (1.22 mmol, 1.1 eq) Boc-L-Lys-OH **107** und 0.24 g (1.11 mmol, 1.0 eq) Benzyl-Maltol **2** über drei Stufen erhalten werden. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte mit 6 mL TFA/DCM (1:1) über zwei Stunden mit anschließender Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 8.41 (d, 1H 3J = 7.2 Hz, 6-CH), 7.89 (d, 2H, 3J = 7.5 Hz, Fmoc- CH_{ar}), 7.71 (t, 2H, 3J = 7.5 Hz, Fmoc- CH_{ar}), 7.62 (d, 1H, 3J = 8.2 Hz, α -NH), 7.46-7.36 (m, 7H, Fmoc- CH_{ar} , Ph), 7.32 (d, 2H, 3J = 7.5 Hz, 7.24 (d, 1H, 3J = 7.2 Hz, 5-CH), 5.08 (s, 2H, Ph- CH_2), 4.35-4.19 (m, 4H, ϵ - CH_2 , 8-CH, 9- CH_2), 3.94 (q, 1H, 3J = 8.2 Hz, α -CH), 2.44 (s, 3H, CH_3), 1.79-1.59 (m, 4H, β - CH_2 , γ - CH_2), 1.42-1.29 (m, 2H, γ - CH_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): δ = 173.7 (CO_2H), 163.8 (C-4), 156.1 (CO_{Fmoc}), 149.3 (C-3), 143.7 ($\text{C}_{\text{q,Fmoc}}$), 142.1 (C-6), 140.7 (C-2), 136.0 ($\text{C}_{\text{q,Ph}}$), 128.7 (CH_{Ph}), 128.5 (CH_{Ph}), 128.4 (CH_{Ph}), 127.6 ($\text{CH}_{\text{Fmoc,ar}}$), 127.0 ($\text{CH}_{\text{Fmoc,ar}}$), 125.2 ($\text{CH}_{\text{Fmoc,ar}}$), 120.1 ($\text{CH}_{\text{Fmoc,ar}}$), 112.7 (C-5), 74.2 (Ph- CH_2), 65.5 (C-9), 53.9 (C-8), 53.5 (α -C), 46.6 (ϵ -C), 30.1 (β -C), 28.9 (δ -C), 22.0 (γ -C), 14.0 (CH_3) ppm.

9.5.7.14 Synthese von Mom-Maltol



3.50 g (27.8 mmol, 1.0 eq) Maltol **1** wurden in 50 mL Dichlormethan gelöst, mit 9.50 mL (7.03 g, 54.2 mmol, 2.0 eq) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt und so lange gerührt bis eine homogene Lösung entstanden war. Es wurden 2.42 mL (2.46 g, 30.6 mmol, 1.1 eq) Chlormethylmethylether tropfenweise hinzugefügt und die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 100 mL Wasser hinzugefügt und die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde dreifach mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc, $R_f = 0.43$) Es wurden 3.80 g (22.3 mmol, 80%) Mom-Maltol **105** als rotes Öl erhalten.

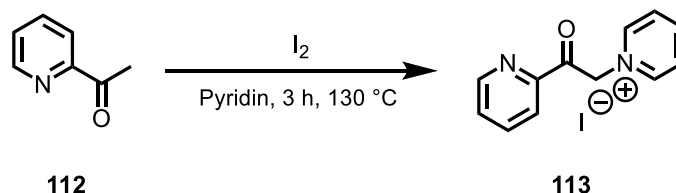
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6): $\delta = 8.07$ (d, 1H, $^3J = 5.6$ Hz, 6-CH), 6.34 (d, 1H, $^3J = 5.6$ Hz, 5-CH), 5.08 (s, 2H, CH_2), 3.43 (s, 3H, OCH_3), 2.31 (s, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6): $\delta = 173.6$ (C-4), 159.0 (C-2), 155.1 (C-6), 141.6 (C-3), 116.3 (C-5), 96.3 (OCH_2), 56.8 (OCH_3), 14.6 (CH_3) ppm.

HRMS: (ESI $^+$, MeOH) für $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{Si}^+$ (MH^+) ber.: 171.0657; gef.: 171.0656.

9.5.8 Synthese modifizierter Carbonsäuren

9.5.8.1 Synthese von (2-Pyridacyl)-pyridiniumiodid



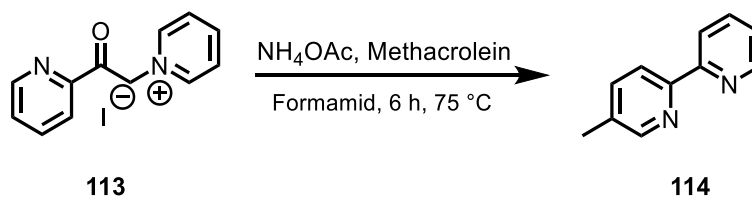
4.07 g (16.0 mmol, 1.2 eq) elementares Iod wurden in 14 mL warmen Pyridin gelöst. 1.61 g (13.3 mmol, 1.0 eq) 2-Acetylpyridin **112** wurden in 4.5 mL Pyridin gelöst und zur warmen Iod-Lösung hinzugefügt. Die Lösung wurde für drei Stunden bei 130 °C gerührt. Nach Abkühlen der Lösung wurde der erhaltene Niederschlag abfiltriert und mit Pyridin gewaschen. Es wurden 3.77 g (11.6 mmol, 89%) (2-Pyridacyl)-pyridiniumiodid **113** als schwarzer Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 9.01 (d, 2H, ³J = 6.3 Hz, 2'-CH, 6'-CH), 8.87 (dt, 1H, ³J = 4.5 Hz, ⁴J = 0.9 Hz, 6-CH), 8.73 (tt, 1H, ³J = 6.3 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 4-CH), 8.28 (m, 2H, 3'-CH, 5'-CH), 8.14 (td, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 4'-CH), 8.08-8.06 (m, 2H, 3-CH), 7.83 (ddd, ³J = 12 Hz, ³J = 4.7 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 5-CH), 6.51 (CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ = 194.1 (CO), 150.4 (C-6), 149.5 (C-6'), 146.3 (C-2'), 146.2 (C-4), 138.1 (C-4'), 129.1 (C-5), 127.7 (2C, C-3', C-5'), 122.0 (C-3), 66.6 (CH₂) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₂H₁₂N₂O⁺ (MH⁺) ber.: 199.0858; gef.: 199.0866

9.5.8.2 Synthese von 5-Methyl-2,2'-bipyridin



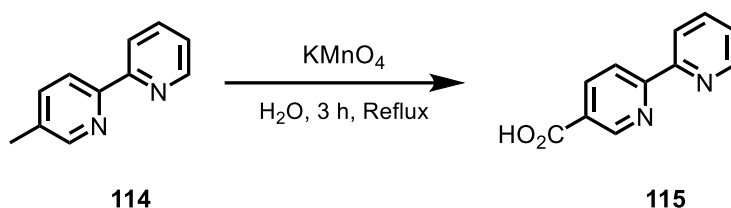
1.50 g (4.61 mmol, 1.0 eq) (2-Pyridacyl)-pyridiniumiodid **113** wurden in 15 mL Formamid gelöst. 430 μL (0.36 g, 5.07 mmol, 1.1 eq) Methacrolein und 0.82 g (10.6 mmol, 2.3 eq) Ammoniumacetat wurden hinzugefügt und die Lösung wurde für sechs Stunden bei 75 °C gerührt. Nach Abkühlen der Lösung wurden 40 mL Wasser hinzugefügt und die wässrige Phase wurde dreifach mit je 60 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 -getrocknet, das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand wurde *in vacuo* getrocknet. Es wurden 0.75 g (4.41 mmol, 96%) von **114** als gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 300 K, DMSO-d_6): δ = 8.56 (dd, 1H, 3J = 4.8 Hz 4J = 0.9 Hz, 3-CH), 8.51 (d, 4J = 1.0 Hz 1H, 6'-CH), 8.36 (d, 1H, 3J = 8.1 Hz, 3'-CH), 8.28 (dd, 1H, 3J = 8.1 Hz, 4J = 0.5 Hz 6-CH), 7.91 (td, 3J = 7.9 Hz, 4J = 1.8 Hz, 4-CH), 7.75 (dd, 3J = 8.1 Hz, 4J = 0.5 Hz, 4'-CH), 7.41 (ddd, 1H, 3J = 8.1 Hz, 4J = 4.8 Hz, 4J = 1.2 Hz, 5-CH), 2.35 (s, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 300 K, DMSO-d_6): δ = 155.3 (C-2'), 152.7 (C-2), 149.6 (C-6'), 149.1 (C-3), 137.5 (C-4'), 137.1 (C-4), 133.5 (C-5'), 123.7 (C-5), 120.0 (C-3'), 119.8 (C-6), 17.7 (CH_3) ppm.

HRMS: (ESI^+ , MeOH) für $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2^+$ (MH^+) ber.: 171.0917; gef.: 171.0917.

9.5.8.3 Synthese von [2,2'-Bipyridin]-5-carbonsäure



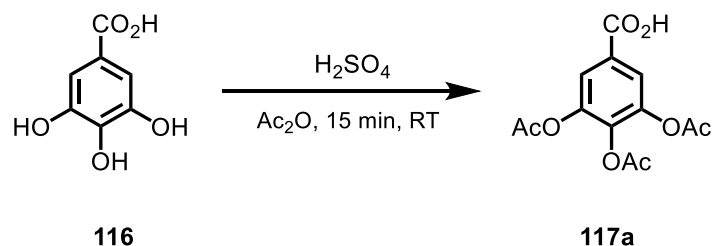
0.50 g (2.94 mmol, 1.0 eq) 5-Methyl-2,2'-Bipyridin **114** wurden in 20 mL Wasser gelöst und mit 1.67 g (10.6 mmol, 3.6 eq) Kaliumpermanganat versetzt. Die Lösung wurde für drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurde der erhaltene Braunstein abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Mit 6 M Salzsäure wurde der pH-Wert des Filtrats auf pH = 1.5 eingestellt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 5 mL Wasser aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelagert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und *in vacuo* getrocknet. Es wurden 0.51 g (2.55 mmol, 87%) [2,2'-Bipyridin]-5-carbonsäure **115** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 9.18 (dd, 1H, ⁴*J* = 2.1 Hz, ⁵*J* = 0.8 Hz, 6'-CH), 8.78 (ddd, 1H, ³*J* = 5.0 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz, ⁵*J* = 0.8 Hz, 3-CH), 8.57-8.53 (m, 2H, 3'-CH, 4'-CH), 8.16 (m, 1H, 4-CH), 7.56 (tdd, 1H, ³*J* = 7.6 Hz, ³*J* = 1.6 Hz, ⁴*J* = 4.8 Hz, ⁴*J* = 1.0 Hz, 5-CH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 165.8 (CO₂H), 156.5 (C-2'), 152.5 (C-2), 150.5 (C-6'), 145.2 (C-3), 139.5 (C-4'), 138.5 (C-4), 125.8 (C-5'), 122.3 (C-3'), 120.9 (C-6), 119.5 (C-5') ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₁H₉N₂O₂⁺ (MH⁺) ber.: 201.0659; gef.: 201.0659.

9.5.8.4 Synthese von 3,4,5-Triacetoxybenzoesäure

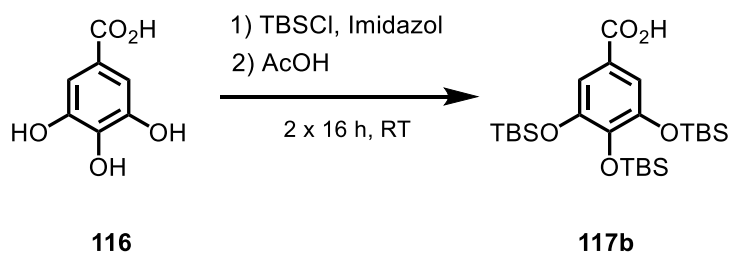


0.50 g (2.94 mmol, 1.0 eq) Gallussäure **116** wurden in 1.70 mL Essigsäureanhydrid gelöst und mit zwei Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 10 mL Wasser hinzugefügt und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und *in vacuo* getrocknet. Es wurden 0.81 g (2.73 mmol, 93%) 3,4,5-Triacetoxybenzoesäure **117** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 7.86 (s, 2H, CH_{ar.}), 2.31 (s, 6H, 3-CH₃, 5-CH₃), 2.30 (s, 3H, 4-CH₃) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆): δ = 169.6 (CO), 167.7 (CO), 166.5 (CO), 143.6 (2C, C-3, C-5), 139.4 (C_{q,Ph}), 127.4 (C_{q,Ph}), 122.9 (2C, C-2, C-6), 20.7 (CH₃), 20.5 (CH₃), 20.3 (CH₃) ppm.

HRMS: (ESI⁺, MeOH) für C₁₃H₁₂O₈Na⁺ (MNa⁺) ber.: 319.0246; gef.: 319.0244.

9.5.8.5 Synthese von TBS₃-Gallussäure

1.00 g (5.88 mmol, 1.0 eq) Gallussäure **116** wurden in 25 mL DMF gelöst und mit 4.00 g (58.8 mmol, 10 eq), sowie 5.00 g (33.2 mmol, 5.6 eq) TBSCl versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit 50 mL Diethylether versetzt und vierfach mit je 100 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 90 mL THF gelöst und mit 120 mL eines 3:1-Gemisches aus Essigsäure und Wasser versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 300 mL Wasser verdünnt und dreifach mit je 300 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 2.20 g (4.29 mmol, 73%) TBS₃-Gallussäure **117b** als farbloser Feststoff erhalten.

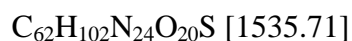
¹H-NMR (500 MHz, 300 K, CDCl₃): δ = 7.28 (s, 2H, CH_{Ar}), 0.99 (s, 9H, (CH₃)₃), 0.96 (s, 18H, 2 x (CH₃)₃), 0.24 (s, 12H, 2 x (CH₃)₂), 0.15 (s, 6H, (CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, 300 K, CDCl₃): δ = 171.4 (CO₂H), 148.6 (CO), 144.2 (CO), 121.1 (C_q), 116.2 (CH_{Ar}), 26.3 ((CH₃)₃), 26.2((CH₃)₃), 18.9 (C_q, *t*Bu), 18.6 (C_q, *t*Bu) -3.6 ((CH₃)₃), -3.7 ((CH₃)₃) ppm.

²⁹Si-NMR (99 MHz, 300 K, CDCl₃): δ = 24.9, 23.0 ppm.

9.6 Peptidsynthesen

9.6.1 Synthese von Peptid P1



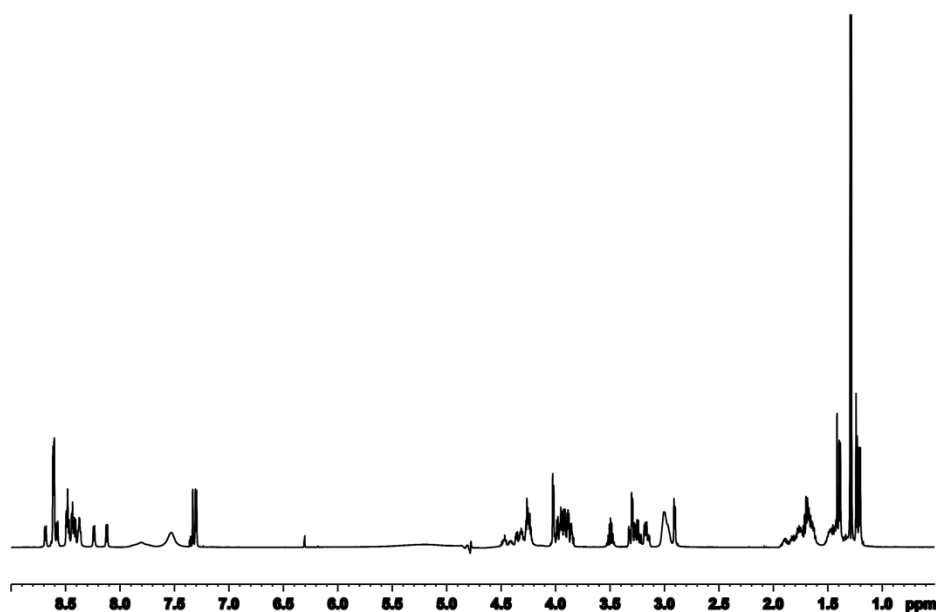
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt. Nach Aufreinigung wurden 7.60 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.6 mL/min, 5-30% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 5.10$ min, Reinheit 95%.

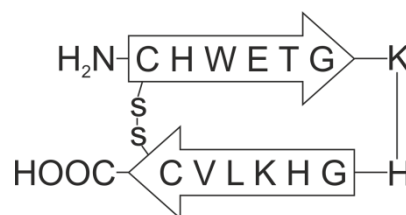
Semiprep-HPLC (15 mL/min, 5-25% MeCN in H₂O in 40 min):
 $t_r = 6.58$ min, Reinheit 93%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 5-25% MeCN in H₂O in 40 min):
für C₆₂H₁₀₄N₂₄O₂₀S²⁺ (M+2H⁺) ber.: 769.8550, gef.: 769:8543.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
1.60 mg in 600 µL:



9.6.2 Synthese von Peptid P2

[dsb^{1,14}]H-CHWETGKHHGHKLVC-OHC₇₁H₁₀₄N₂₃O₁₈S₂ [1632.88]

Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 31 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.6 mL/min, 5-30% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 6.30 min, Reinheit 96%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 9.37 min, Reinheit 65%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 40 min):
 für C₇₁H₁₀₄N₂₃O₁₈S₂²⁺ (M²⁺) ber.: 816.4505, gef.: 816.4512.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 4.30 mg in 600 µL:

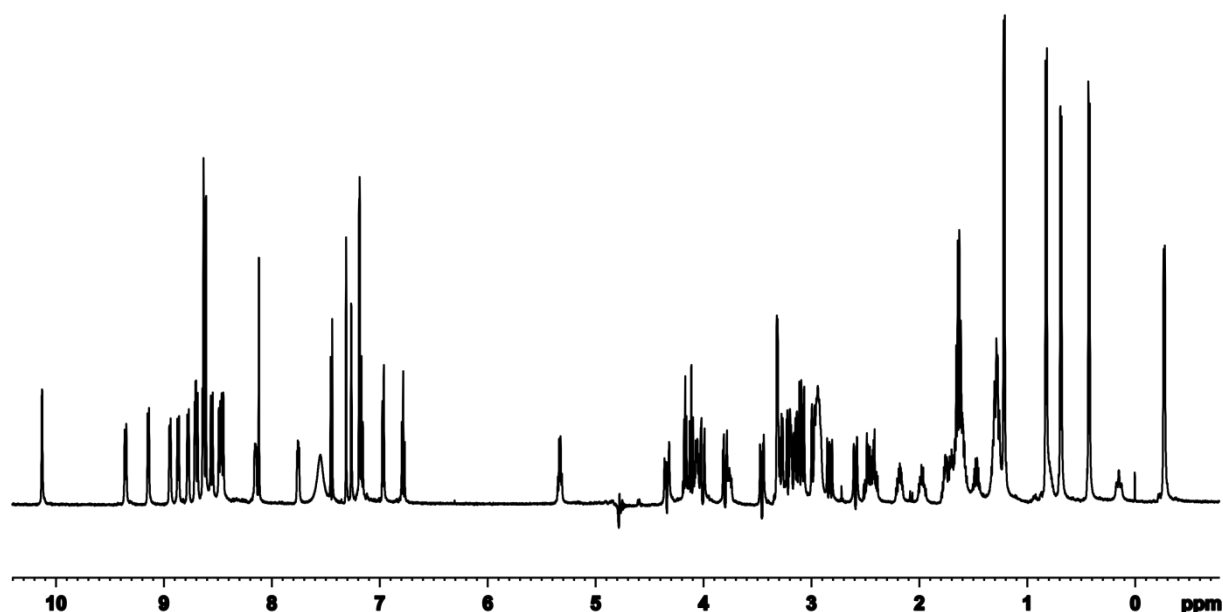
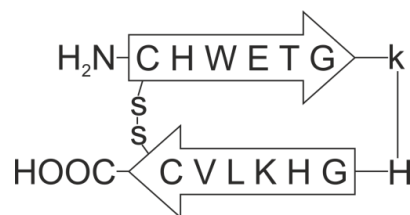


Tabelle 9-1: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P2**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	n.v.	3.00, 2.51	-	-	-	-
His ²	d	9.15	4.86	3.29		δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	
Trp ³	d	8.94	4.90	3.05	-	δ^1 : 7.26	ϵ^1 : 10.3 ϵ^3 : 7.16	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.78 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.36	4.89	2.22, 1.98	2.47	-	-	-
Thr ⁵	d	8.77	4.58	4.14	1.24	-	-	-
Gly ⁶	dd	8.15	4.33, 3.99	-	-	-	-	-
Lys ⁷	d	8.71	4.04	1.64	1.26	1.26	n.v.	-
His ⁸	d	8.64	4.83	3.43, 3.08	-	δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	-
Gly ⁹	dd	7.75	4.36, 3.79	-	-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.69	5.35	3.27, 3.08	-	δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Lys ¹¹	d	8.86	4.72	1.71	1.29	1.29	2.91	-
Leu ¹²	d	8.48	3.74	1.20, 0.16	0.81	0.43, -0.27	-	-
Val ¹³	d	8.43	4.13	1.47	0.81, 0.68	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.45	4.59	3.22, 2.82	-	-	-	-

9.6.3 Synthese von Peptid P3

[dsb^{1,14}]H-CHWETGkHGHKLVC-OHC₇₁H₁₀₄N₂₃O₁₈S₂ [1632.88]

Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 22 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.6 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 5.44$ min, Reinheit 100%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 9.45$ min, Reinheit 87%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 40 min):
 für C₇₁H₁₀₄N₂₃O₁₈S₂²⁺ (M⁺) ber.: 1632.7518, gef.: 1632.7522.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.10 mg in 600 µL:

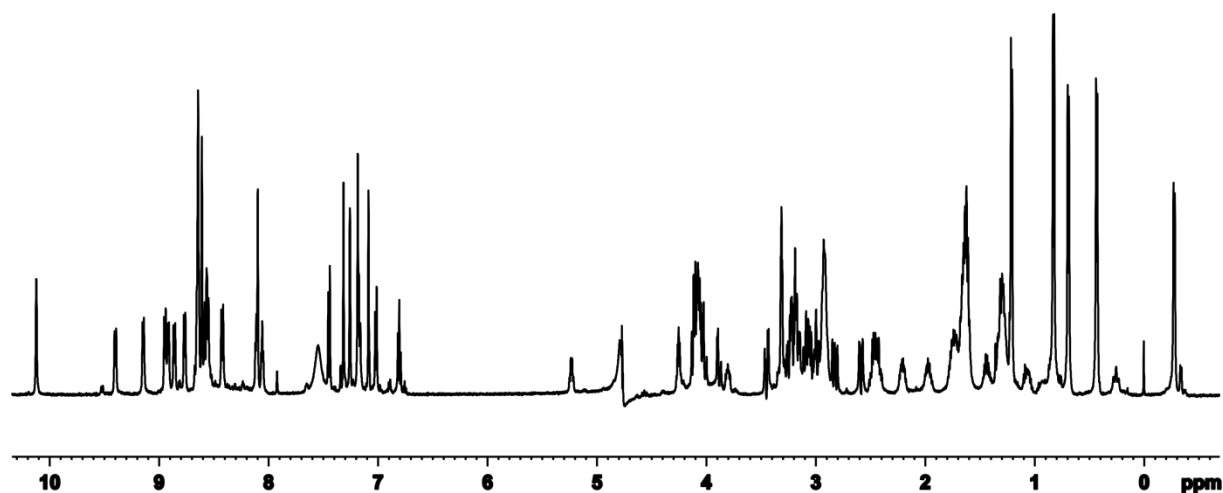
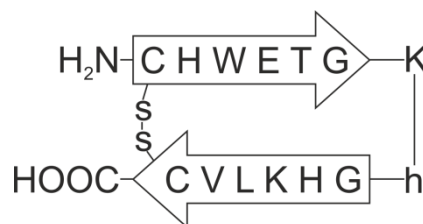


Tabelle 9-2: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P3**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	n.v.	3.00, 2.51	-	-	-	-
His ²	d	9.14	4.86	3.31		δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	
Trp ³	d	8.9111	4.93	3.08, 2.99	-	δ^1 : 7.26	ϵ^1 : 10.3 ϵ^3 : 7.16	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.78 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.39	4.87	2.20, 1.96	2.44	-	-	-
Thr ⁵	d	8.76	4.63	4.25	1.21	-	-	-
Gly ⁶	dd	8.10	4.08, 3.99	-	-	-	-	-
Lys ⁷	d	8.65	4.08	1.65	1.26	1.26	n.v.	-
His ⁸	d	8.94	4.76	3.44, 3.16	-	δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	-
Gly ⁹	dd	7.75	4.36, 3.79	-	-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.69	5.35	3.27, 3.08	-	δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Lys ¹¹	d	8.86	4.72	1.71	1.29	1.29	2.91	-
Leu ¹²	d	8.55	3.74	1.20, 0.16	0.81	0.43, -0.27	-	-
Val ¹³	d	8.45	4.13	1.47	0.81, 0.68	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.42	4.59	3.22, 2.82	-	-	-	-

9.6.4 Synthese von Peptid P4

[dsb^{1,14}]H-CHWETGKhGHKLVC-OHC₇₁H₁₀₄N₂₃O₁₈S₂ [1632.88]

Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 27 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 0.78$ min, Reinheit 96%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 9.77$ min, Reinheit 86%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 40 min):
 für C₇₁H₁₀₄N₂₃O₁₈S₂²⁺ (M⁺) ber.: 1632.7518, gef.: 1632.7520.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 1.60 mg in 600 µL:

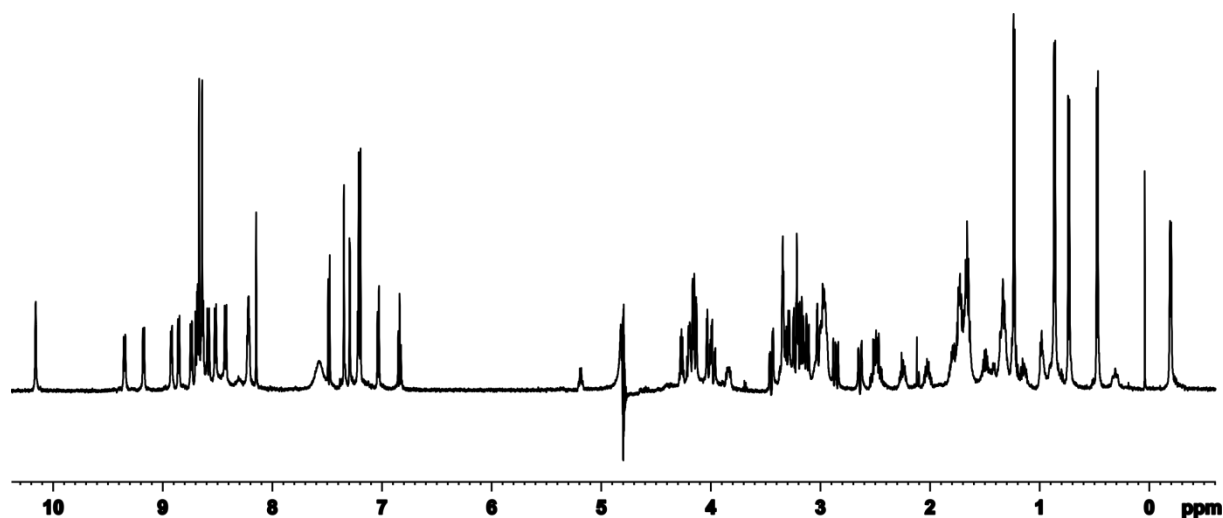
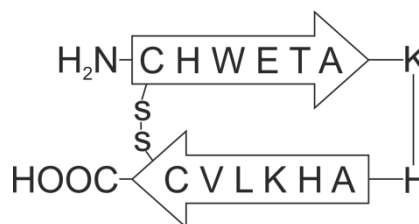


Tabelle 9-3: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P4**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	4.00	3.00, 2.51	-	-	-	-
His ²	d	9.14	4.68	3.30		δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	
Trp ³	d	8.91	4.93	3.08, 2.98	-	δ^1 : 7.26	ϵ^1 : 10.3 ϵ^3 : 7.16	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.78 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.31	4.81	2.19, 1.99	2.44	-	-	-
Thr ⁵	d	8.76	4.61	4.22	1.21	-	-	-
Gly ⁶	m*	8.18	4.10, 3.96	-	-	-	-	-
Lys ⁷	d	8.59	4.15	1.65	1.26	1.26	n.v.	-
his ⁸	d	8.81	4.76	3.41, 3.17	-	δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	-
Gly ⁹	m*	8.18	4.10, 3.96	-	-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.69	5.35	3.27, 3.08	-	δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Lys ¹¹	d	8.79	4.70	1.71	1.29	1.29	2.91	-
Leu ¹²	d	8.48	3.80	1.20, 0.16	0.81	0.43, -0.27	-	-
Val ¹³	d	8.55	4.09	1.46	0.81, 0.69	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.39	4.53	3.18, 2.81	-	-	-	-

*Überlagerung der NH und α -CH₂-Signale von Gly⁶ und Gly⁹.

9.6.5 Synthese von Peptid P5

[dsb^{1,14}]H-CHWETAKHAHKLVC-OHC₇₃H₁₀₉N₂₃O₁₈S₂ [1660.94]

Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 25 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 6.08 min, Reinheit 97%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 9.92 min, Reinheit 92%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 40 min):
 für C₇₃H₁₀₉N₂₃O₁₈S₂²⁺ (M⁺) ber.: 1660.9411, gef.: 1660.9405.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.50 mg in 600 µL:

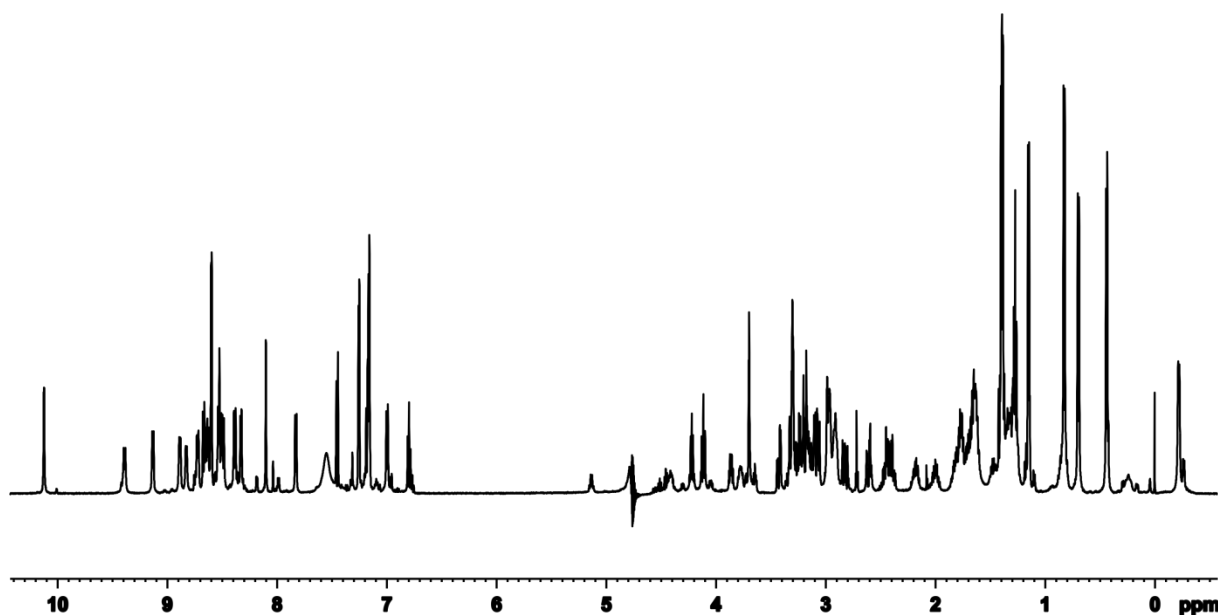
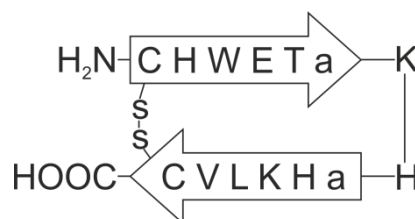


Tabelle 9-4: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P5**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	4.05	2.99, 2.51	-	-	-	-
His ²	d	9.13	4.85,	3.30		δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	
Trp ³	d	8.88	4.88	3.06, 2.97	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.39	4.81	2.19, 1.99	2.44	-	-	-
Thr ⁵	d	8.76	4.61	4.22	1.21	-	-	-
Ala ⁶	d	8.32	4.45	1.37	-	-	-	-
Lys ⁷	d	8.71	4.70	1.74	1.27	1.26	2.89	-
His ⁸	d	8.81	4.76	3.41, 3.17	-	δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	-
Ala ⁹	d	7.82	4.49	1.39	-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.65	5.11	3.22, 3.10	-	δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Lys ¹¹	d	8.79	4.70	1.71	1.29	1.29	2.91	-
Leu ¹²	d	8.48	3.79	1.25, 0.24	0.81	0.43, -0.21	-	-
Val ¹³	d	8.52	4.03	1.46	0.80, 0.70	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.38	4.56	3.17, 2.82	-	-	-	-

9.6.6 Synthese von Peptid P6

[dsb^{1,14}]H-CHWETaKHaHKLVC-OHC₇₃H₁₀₉N₂₃O₁₈S₂ [1660.94]

Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 27 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 6.13 min, Reinheit 100%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 9.63 min, Reinheit 95%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 40 min):
 für C₇₃H₁₀₉N₂₃O₁₈S₂²⁺ (M⁺) ber.: 1660.9411, gef.: 1660.9408.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.10 mg in 600 µL:

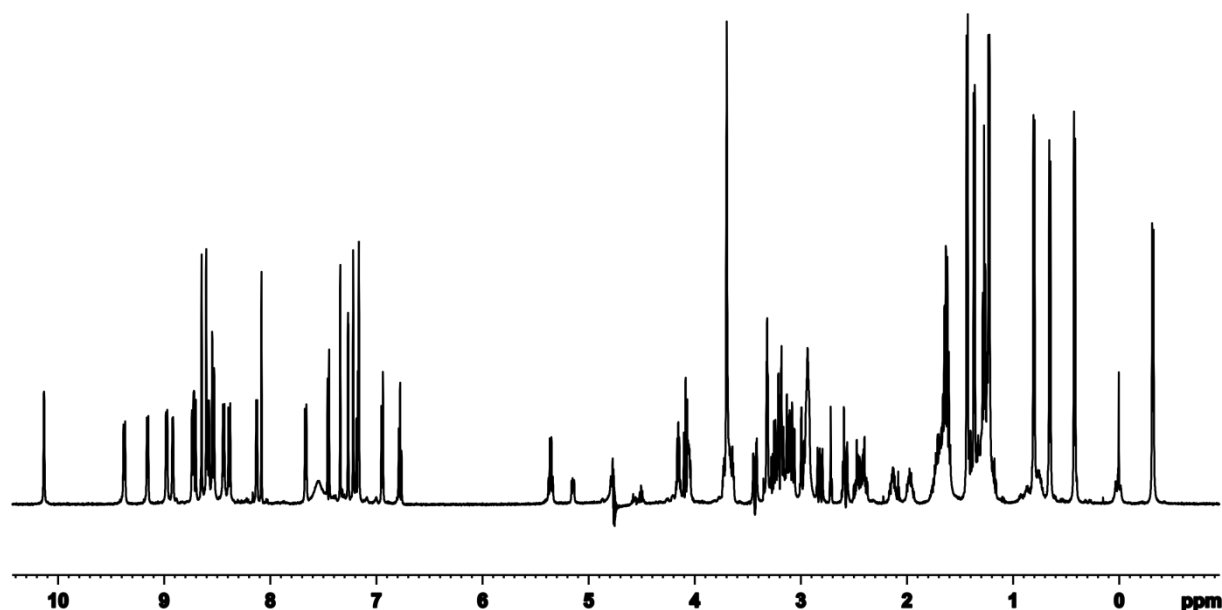
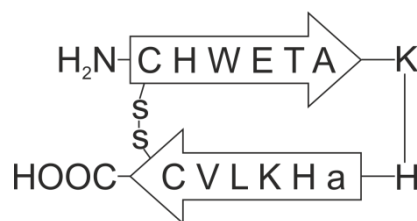


Tabelle 9-5: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P6**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	4.05	2.99, 2.51	-	-	-	-
His ²	d	9.13	4.81	3.30		δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	
Trp ³	d	8.88	4.84	3.07, 2.98	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.38	4.81	2.15, 2.00	2.46	-	-	-
Thr ⁵	d	8.53	5.15	4.14	1.24	-	-	-
ala ⁶	d	8.32	4.56	1.41	-	-	-	-
Lys ⁷	d	8.91	3.99	1.74	1.27	1.26	2.89	-
His ⁸	d	8.81	4.76	3.41, 3.17	-	δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	-
ala ⁹	d	7.66	4.25	1.35	-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.19	5.36	3.22, 3.10	-	δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Lys ¹¹	d	8.72	4.74	1.71	1.28	1.28	2.93	-
Leu ¹²	d	8.48	3.75	1.19, 0.24	0.76	0.45, -0.31	-	-
Val ¹³	d	8.53	4.03	1.46	0.80, 0.70	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.38	4.54	3.21, 2.82	-	-	-	-

9.6.7 Synthese von Peptid P7

[dsb^{1,14}]H-CHWETAKHaHKLVC-OHC₇₃H₁₀₉N₂₃O₁₈S₂ [1660.94]

Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 18 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 6.07$ min, Reinheit 100%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 10.0$ min, Reinheit 97%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₇₃H₁₁₀N₂₃O₁₈S₂⁺ (M-H⁺) ber.: 1661.7908, gef.: 1661.7912.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.50 mg in 600 µL:

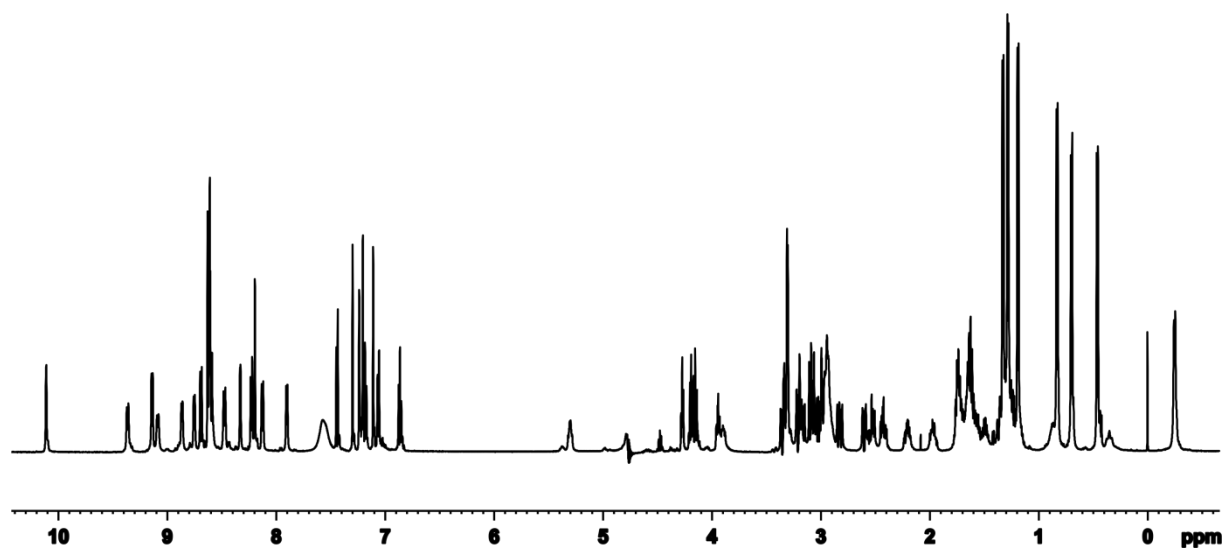
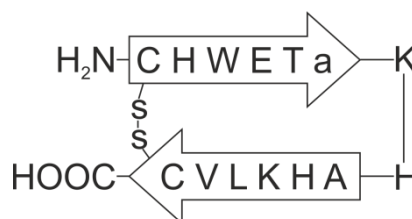


Tabelle 9-6: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P7**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	4.05	2.99, 2.51	-	-	-	-
His ²	d	9.13	4.84	3.32		δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	
Trp ³	d	8.86	4.99	3.11, 2.98	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.35	4.97	2.22, 1.96	2.53, 2.43	-	-	-
Thr ⁵	d	8.75	4.27	4.20	1.30	-	-	-
Ala ⁶	d	8.23	4.23	1.35	-	-	-	-
Lys ⁷	d	8.32	3.98	1.74, 1.56	1.27	1.26	2.89	-
His ⁸	d	8.81	4.76	3.41, 3.17	-	δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	-
ala ⁹	d	7.90	4.48	1.21	-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.68	5.30	3.22, 3.10	-	δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Lys ¹¹	d	9.08	4.97	1.71	1.28	1.28	2.93	-
Leu ¹²	d	8.48	3.75	1.21, 0.35	0.80	0.46, -0.25	-	-
Val ¹³	d	8.53	4.03	1.49	0.84, 0.69	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.47	4.53	3.23, 2.83	-	-	-	-

9.6.8 Synthese von Peptid P8

[dsb^{1,14}]H-CHWETaKHAHKLVLC-OHC₇₂H₁₀₇N₂₃O₁₈S₂ [1646.91]

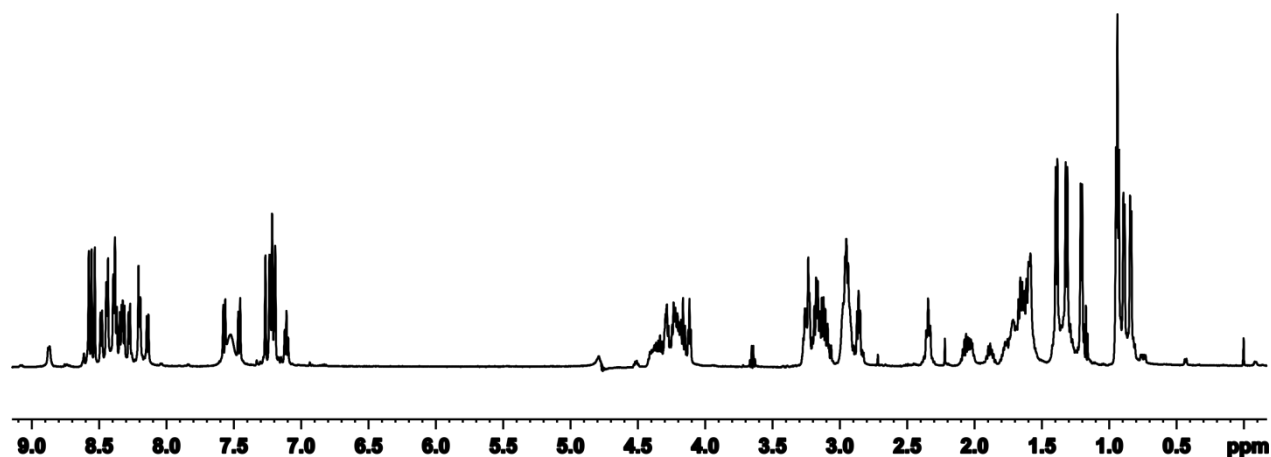
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 21 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 0.97$ min, Reinheit 95%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 12.2$ min, Reinheit 56%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₇₂H₁₀₉N₂₃O₁₈S₂²⁺ (M-H²⁺) ber.: 830.8955, gef.: 830.8956.

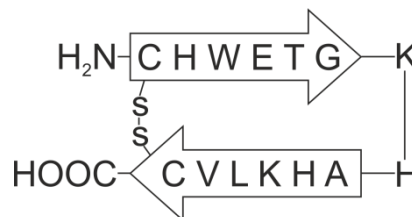
¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.00 mg in 600 µL:



9.6.9 Synthese von Peptid P9

[dsb^{1,14}]H-CHWETGKHAHKLVLC-OH

C₇₂H₁₀₇N₂₃O₁₈S₂ [1646.94]



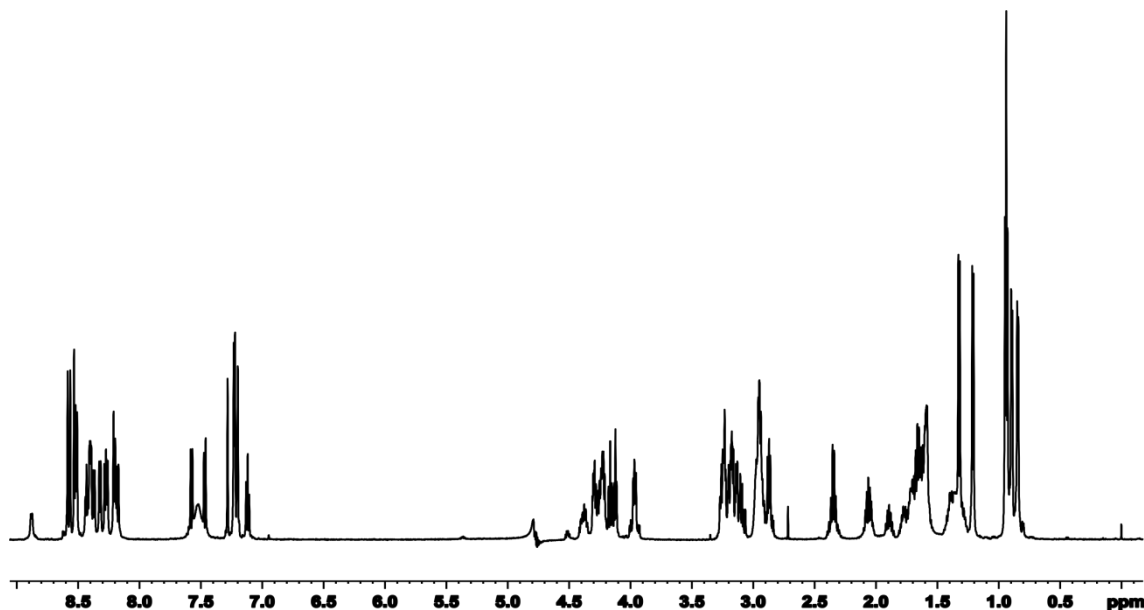
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 23 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 0.95$ min, Reinheit 99%.

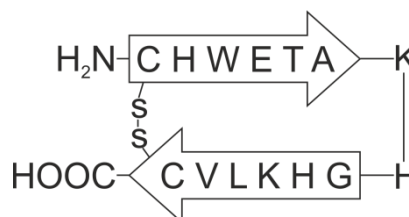
Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 12.0$ min, Reinheit 97%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₇₂H₁₀₉N₂₃O₁₈S₂²⁺ (M-H²⁺) ber.: 823.8878, gef.: 823.8878.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.00 mg in 600 µL:



9.6.10 Synthese von Peptid P10

[dsb^{1,14}]H-CHWETAKHGHKLVC-OH $C_{72}H_{107}N_{23}O_{18}S_2$ [1660.94]

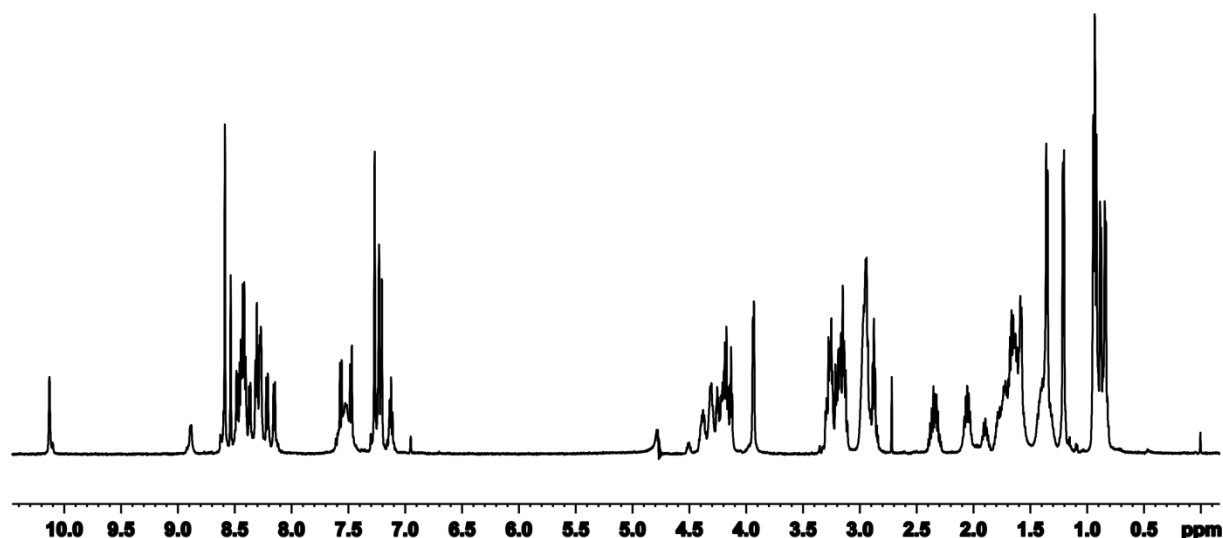
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 11 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 0.93$ min, Reinheit 99%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 12.3$ min, Reinheit 56%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für $C_{72}H_{109}N_{23}O_{18}S_2^{2+}$ (M-H²⁺) ber.: 830.8955, gef.: 830.8956.

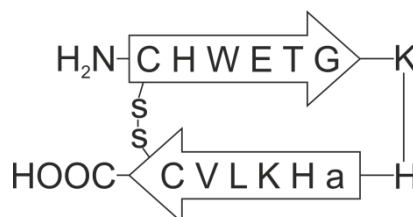
¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.00 mg in 600 µL:



9.6.11 Synthese von Peptid P11

[dsb^{1,14}]H-CHWETGKH_aHKLVC-OH

C₇₂H₁₀₇N₂₃O₁₈S₂ [1660.94]



Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 18 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 0.85$ min, Reinheit 100%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 8.93$ min, Reinheit 94%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₇₂H₁₀₇N₂₃O₁₈S₂⁺ (M⁺) ber.: 1646.7679, gef.: 1646.7676.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.10 mg in 600 µL:

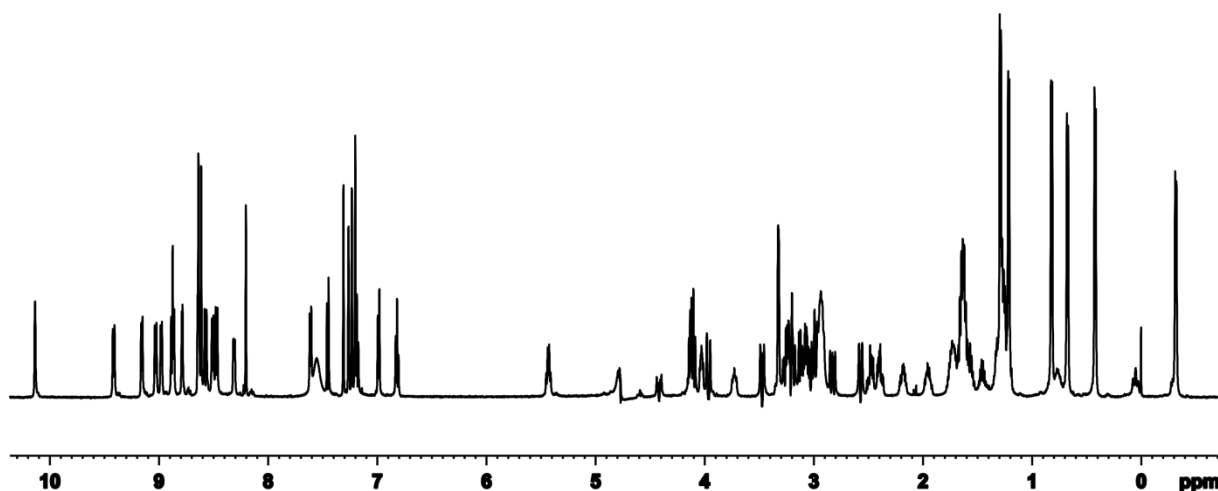


Tabelle 9-7: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P11**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

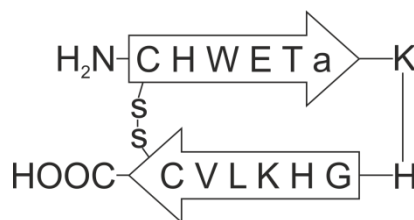
AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	4.05	2.99, 2.51	-	-	-	-
His ²	d	9.15	4.83	3.31		δ^2 : 7.28	ϵ^1 : 8.60	
Trp ³	d	8.87	4.91	3.07, 2.98	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.37	4.95	2.20, 1.96	2.47, 2.40	-	-	-
Thr ⁵	d	8.86	4.77	4.12	1.22	-	-	-
Gly ⁶	dd	8.23	4.23		-	-	-	-
Lys ⁷	d	8.77	4.07	1.63	1.30	1.30	2.93	-
His ⁸	d	8.63	4.83	3.49, 3.04	-	δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	-
ala ^{9*}	d	7.90	4.48	1.21	-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.68	5.30	3.22, 3.10	-	δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Lys ¹¹	d	9.02	4.75	1.71	1.30	1.29	2.92	-
Leu ¹²	d	8.49	3.72	1.25, 0.05	0.77	0.42, -0.31	-	-
Val ¹³	d	8.56	4.14	1.51	0.79, 0.70	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.45	4.58	3.22, 2.85	-	-	-	-

*ala⁹-NH nur in TOCSY-Spektrum sichtbar, keine Änderung zwischen 280-320 K.

9.6.12 Synthese von Peptid P12

[dsb^{1,14}]H-CHWETaKHGHLVC-OH

C₇₂H₁₀₇N₂₃O₁₈S₂ [1660.94]



Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 22 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 5.53$ min, Reinheit 99%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 8.93$ min, Reinheit 92%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₇₂H₁₀₉N₂₃O₁₈S₂⁺ (M⁺) ber.: 823.8876, gef.: 823.8881.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.80 mg in 600 µL:

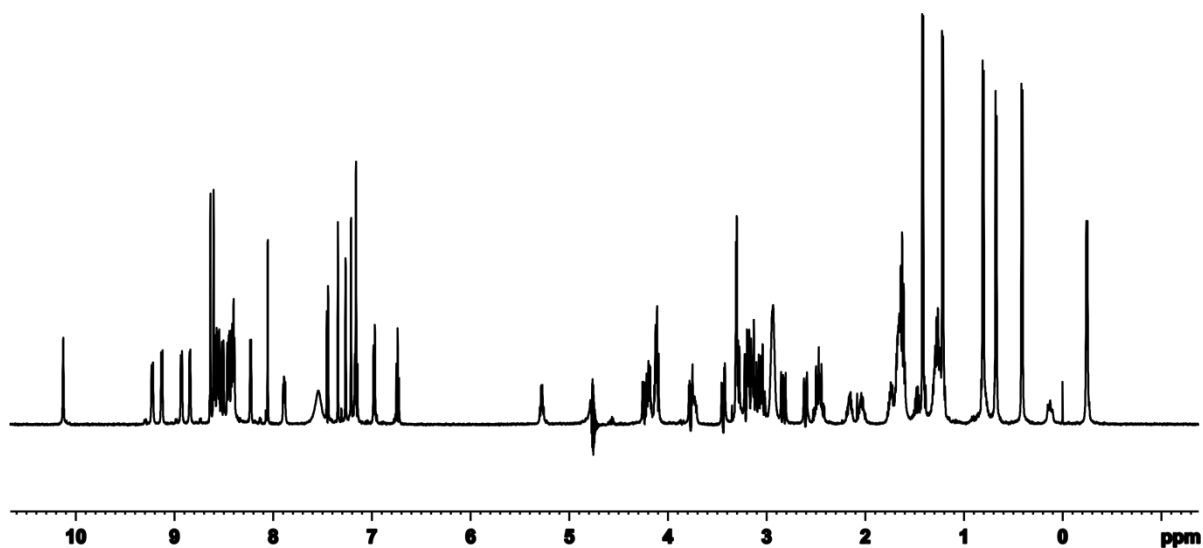


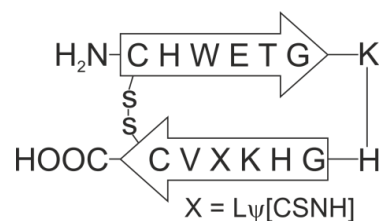
Tabelle 9-8: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P12**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	4.05	2.99, 2.51	-	-	-	-
His ²	d	9.12	4.88	3.29		δ^2 : 7.28	ϵ^1 : 8.60	
Trp ³	d	8.92	4.82	3.07	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.21	4.80	2.18, 1.96	2.51, 2.40	-	-	-
Thr ⁵	d	8.40	4.83	4.15	1.32	-	-	-
ala ⁶	dd	8.22	4.57	1.42	-	-	-	-
Lys ⁷	d	8.83	4.12	1.69	1.30	1.28	2.93	-
His ⁸	d	8.55	4.83	3.44, 3.14	-	δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	-
Gly ⁹	d	7.90	4.23, 3.75		-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.67	5.27	3.29, 3.14	-	δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Lys ¹¹	d	8.46	4.66	1.72, 1.65	1.30	1.27	2.92	-
Leu ¹²	d	8.39	3.75	1.31, 0.14	0.78	0.44, -0.24	-	-
Val ¹³	d	8.51	4.12	1.46	0.87, 0.70	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.55	4.50	3.20, 2.83	-	-	-	-

9.6.13 Synthese von Peptid P13

$[\text{dsb}^{1,14}]\text{H-CHWETGKHHGKL}\psi[\text{CSNH}]\text{VC-OH}$

$\text{C}_{71}\text{H}_{105}\text{N}_{23}\text{O}_{17}\text{S}_3$ [1648.95]

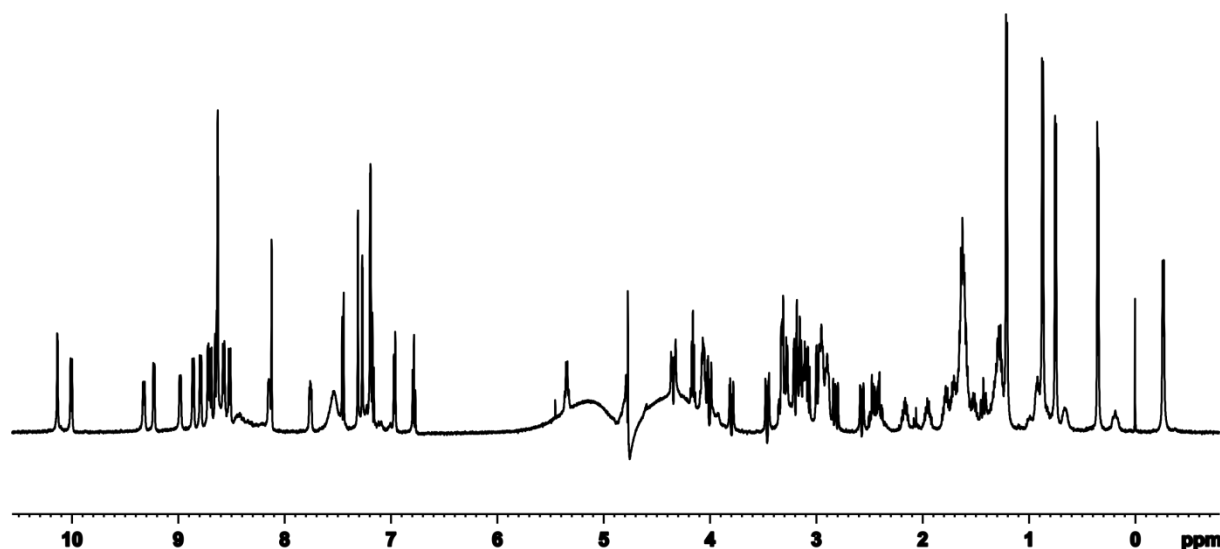


Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 12 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H_2O in 10 min):
 $t_r = 5.86$ min, Reinheit 99%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H_2O in 30 min):
 $t_r = 11.6$ min, Reinheit 46%.

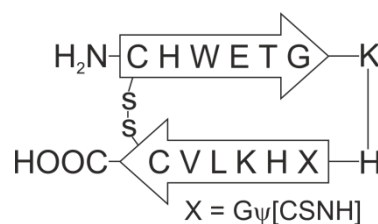
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/ D_2O 9:1, pH 3.0):
 1.90 mg in 600 μL :



9.6.14 Synthese von Peptid P14

$[\text{dsb}^{1,14}]\text{H-CHWETGKHG}\psi[\text{CSNH}]\text{HKLVC-OH}$

$\text{C}_{71}\text{H}_{105}\text{N}_{23}\text{O}_{17}\text{S}_3$ [1648.95]

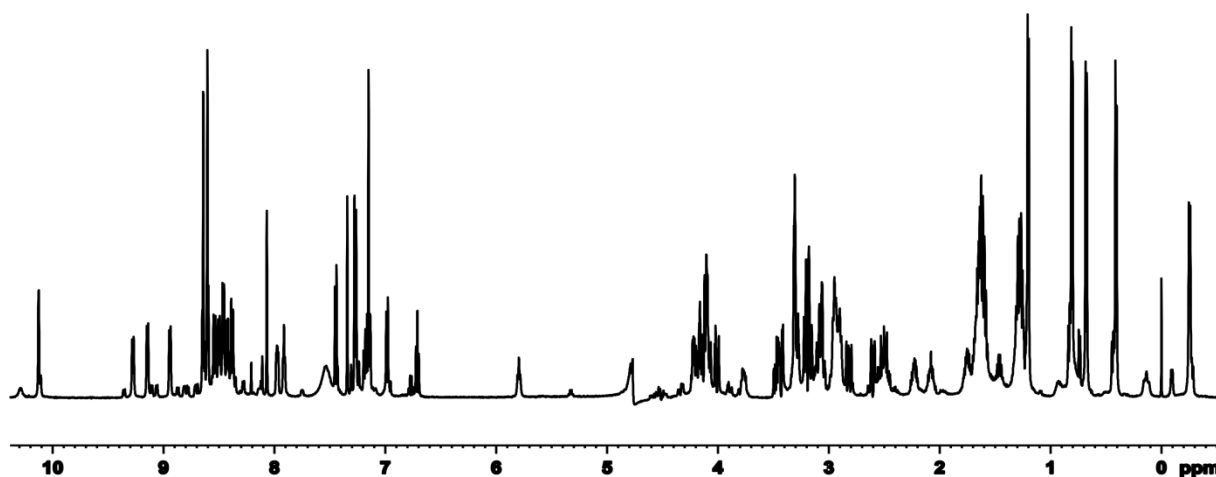


Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 12 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H_2O in 10 min):
 $t_r = 5.36$ min, Reinheit 92%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H_2O in 30 min):
 $t_r = 10.6$ min, Reinheit 79%.

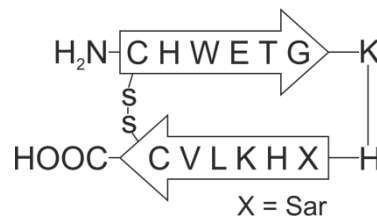
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/ D_2O 9:1, pH 3.0):
 1.90 mg in 600 μL :



9.6.15 Synthese von Peptid P15

[dsb^{1,14}] H-CHWETGKHSarHKLVC-OH

C₇₂H₁₀₇N₂₃O₁₈S₂ [1646.91]



Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 14 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 6.04 min, Reinheit 99%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 9.60 min, Reinheit 86%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₇₂H₁₀₇N₂₃O₁₈S₂⁺ (M⁺) ber.: 1646.9124, gef.: 1646.9130.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.10 mg in 600 µL:

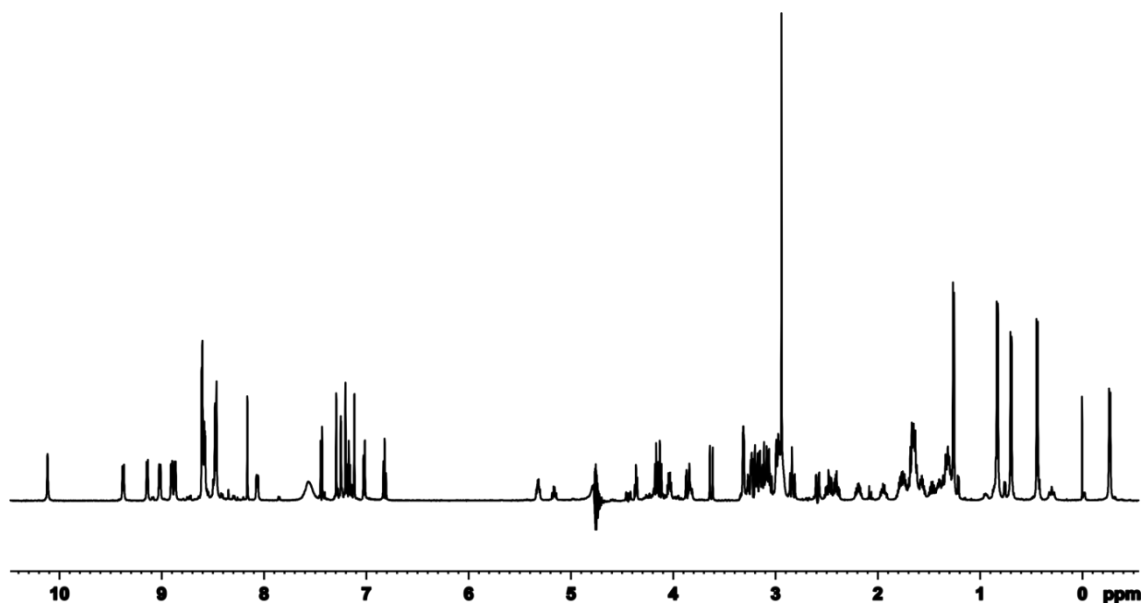


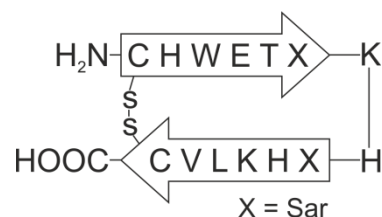
Tabelle 9-9: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P15**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	4.01	3.01, 2.51	-	-	-	-
His ²	d	9.14	4.79	3.24		δ^2 : 7.28	ϵ^1 : 8.60	
Trp ³	d	8.90	4.97	3.08, 2.98	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.37	4.89	2.19, 1.92	2.45	-	-	-
Thr ⁵	d	8.86	4.35	4.18	1.20	-	-	-
Gly ⁶	dd	8.07	4.44, 3.86		-	-	-	-
Lys ⁷	d	8.77	4.01	1.60	1.30	1.30	2.95	-
His ⁸	d	n.v.	4.83	3.49, 3.04	-	δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	-
Sar ⁹	d	7.90	4.48	2.95	-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.60	5.31	3.20, 3.09	-	δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Lys ¹¹	d	9.01	4.81	1.84, 1.71	1.31	1.31	2.95	-
Leu ¹²	d	8.55	3.70	1.25, 0.05	0.79	0.42, -0.25	-	-
Val ¹³	d	8.57	3.88	1.33	0.84, 0.69	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.47	4.55	3.18, 2.90	-	-	-	-

9.6.16 Synthese von Peptid P16

[dsb^{1,14}] H-CHWETSarKHSarHKLVC-OH

C₇₂H₁₀₇N₂₃O₁₈S₂ [1660.94]



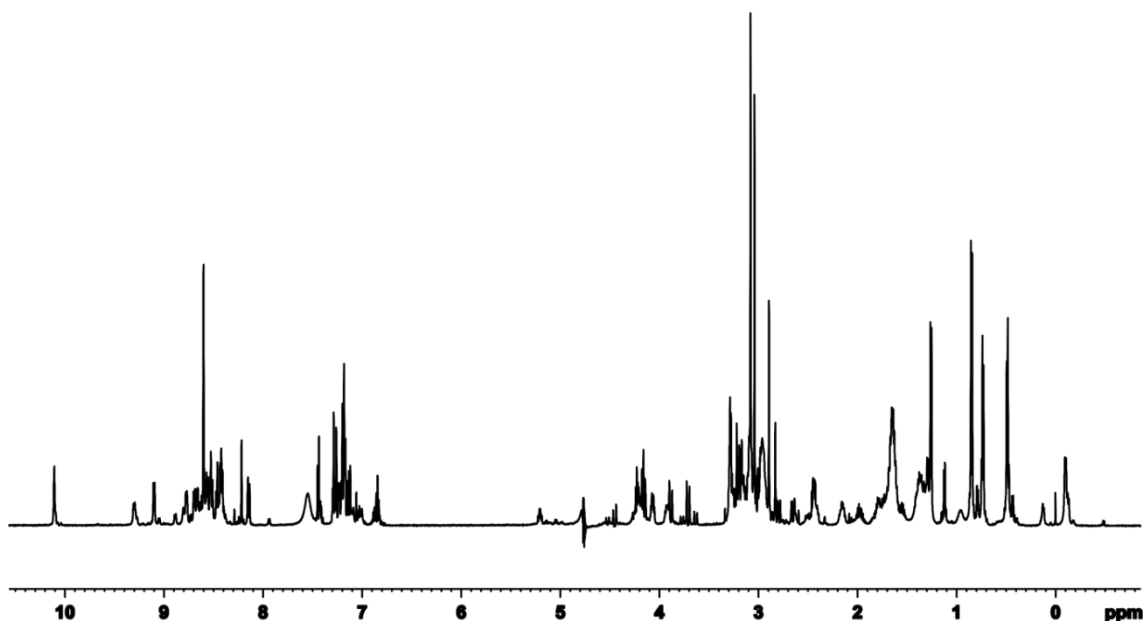
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 17 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 6.04$ min, Reinheit 99%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 9.20$ min, Reinheit 94%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₇₂H₁₀₇N₂₃O₁₈S₂⁺ (M⁺) ber.: 1660.9421, gef.: 1660.9433.

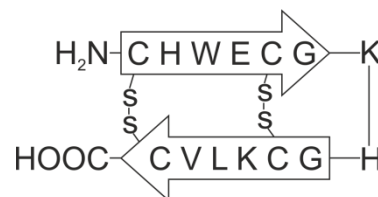
¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 1.90 mg in 600 µL:



9.6.17 Synthese von Peptid P17

[dsb^{1,14}][dsb^{5,10}]H-CHWECGKHGCKLVC-OH

C₆₇H₉₉ N₂₁O₁₇S₄ [1598.90]



Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 21 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 6.79 min, Reinheit 100%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 12.8 min, Reinheit 95%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₆₇H₉₉N₂₁O₁₇S₂⁺ (M⁺) ber.: 1598.9021, gef.: 1598.9028.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 1.90 mg in 600 µL:

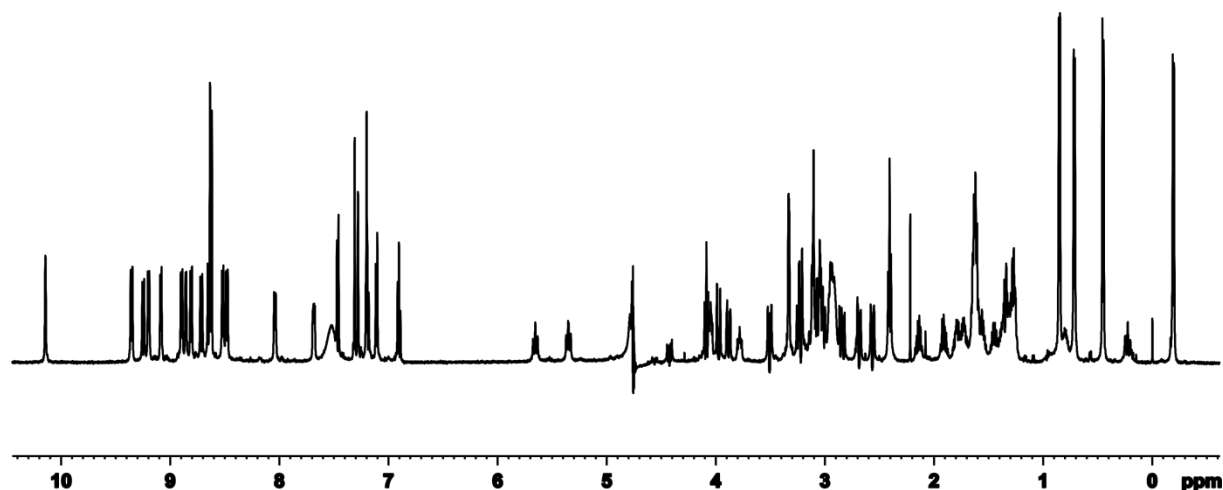
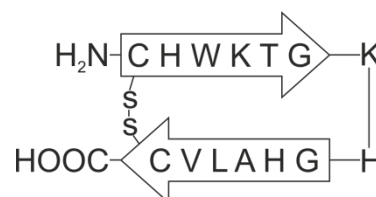


Tabelle 9-10: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P17**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	3.98	3.07, 2.56	-	-	-	-
His ²	d	9.14	4.79	3.24		δ^2 : 7.28	ϵ^1 : 8.60	
Trp ³	d	8.90	4.97	3.08, 2.98	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.35	4.84	2.16, 1.88	2.44	-	-	-
Cys ⁵	d	9.25	5.34	3.35		-	-	-
Gly ⁶	d	8.04	4.42, 3.98		-	-	-	-
Lys ⁷	d	8.86	4.06	1.60	1.30	1.30	2.97	-
His ⁸	d	8.81	4.95	3.50, 3.10	-	δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	-
Gly ⁹	d	7.68	4.57, 3.90		-	-	-	-
Cys ¹⁰	d	8.60	5.31	3.20, 3.09	-	δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Lys ¹¹	d	8.87	4.87	1.83, 1.70	1.37	1.37	2.92	-
Leu ¹²	d	8.51	3.80	1.34, 0.17	0.81	0.42, -0.19	-	-
Val ¹³	d	8.65	4.06	1.46	0.86, 0.73	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.46	4.60	3.20, 2.86	-	-	-	-

9.6.18 Synthese von Peptid P18

[dsb^{1,14}] H-CHWKTGKHGHALVC-OHC₆₉H₁₀₃N₂₃O₁₆S₂ [1574.85]

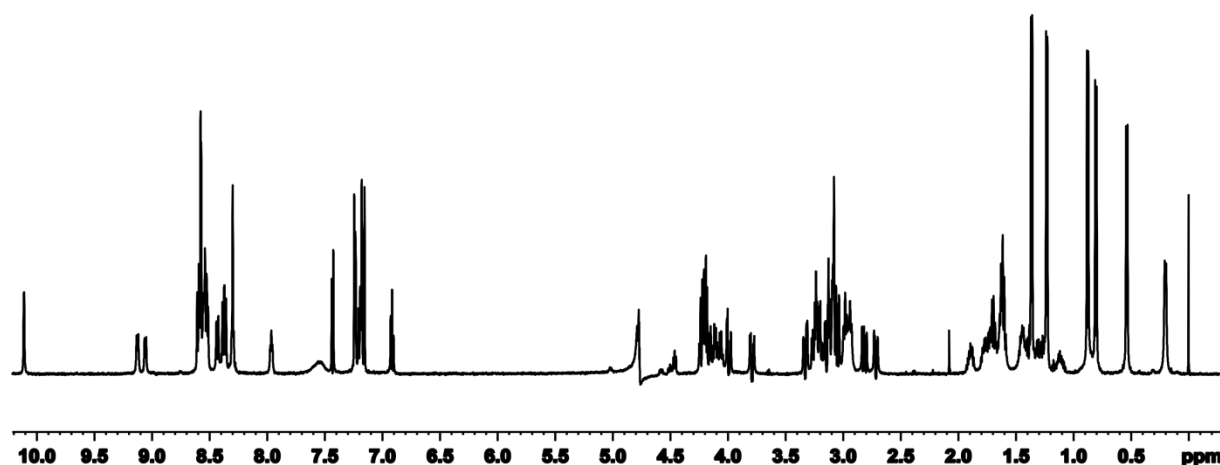
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 16 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 5.47$ min, Reinheit 99%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 9.55$ min, Reinheit 89%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₆₉H₁₀₆N₂₃O₁₆S₂⁺ (M-3H³⁺) ber.: 525.5871, gef.: 525.5867.

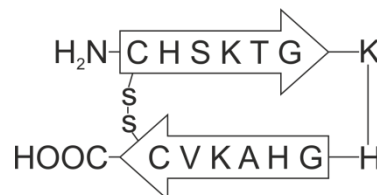
¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 1.30 mg in 600 µL:



9.6.19 Synthese von Peptid P19

[dsb^{1,14}] H-CHSKTGKHHGAKVC-OH

C₆₉H₉₉N₂₃O₁₇S₂ [1490.73]



Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 12 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):

t_r = 1.01 min, Reinheit 99%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):

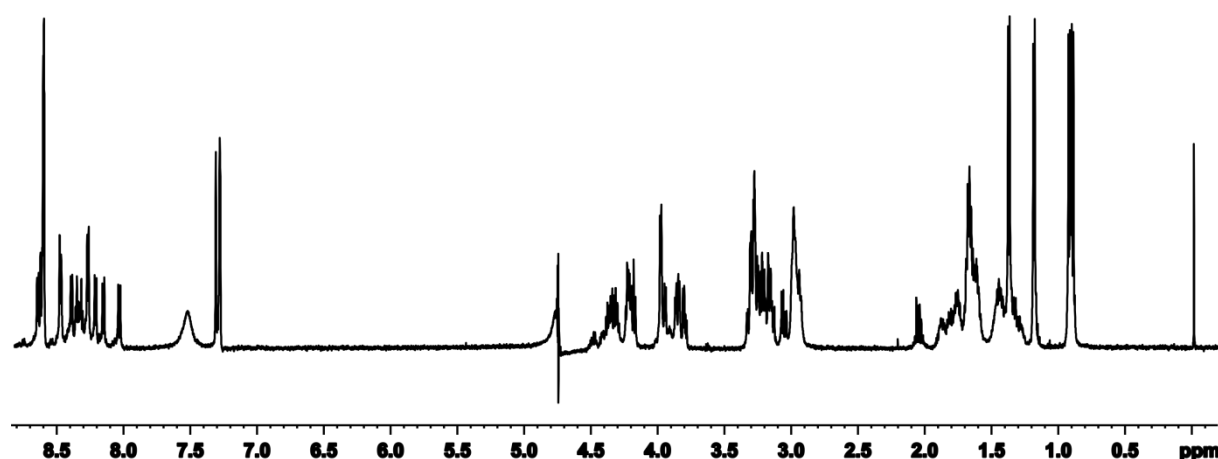
t_r = 4.48 min, Reinheit 65%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):

für C₆₉H₁₀₂N₂₃O₁₇S₂⁺ (M-3H³⁺) ber.: 496.2468, gef.: 496.2463.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):

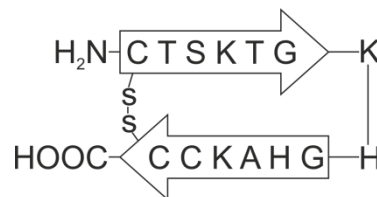
1.30 mg in 600 µL:



9.6.20 Synthese von Peptid P20

[dsb^{1,14}] H-CTSKTGKHHGAKCC-OH

C₅₇H₉₅N₂₁O₁₈S₃ [1458.70]



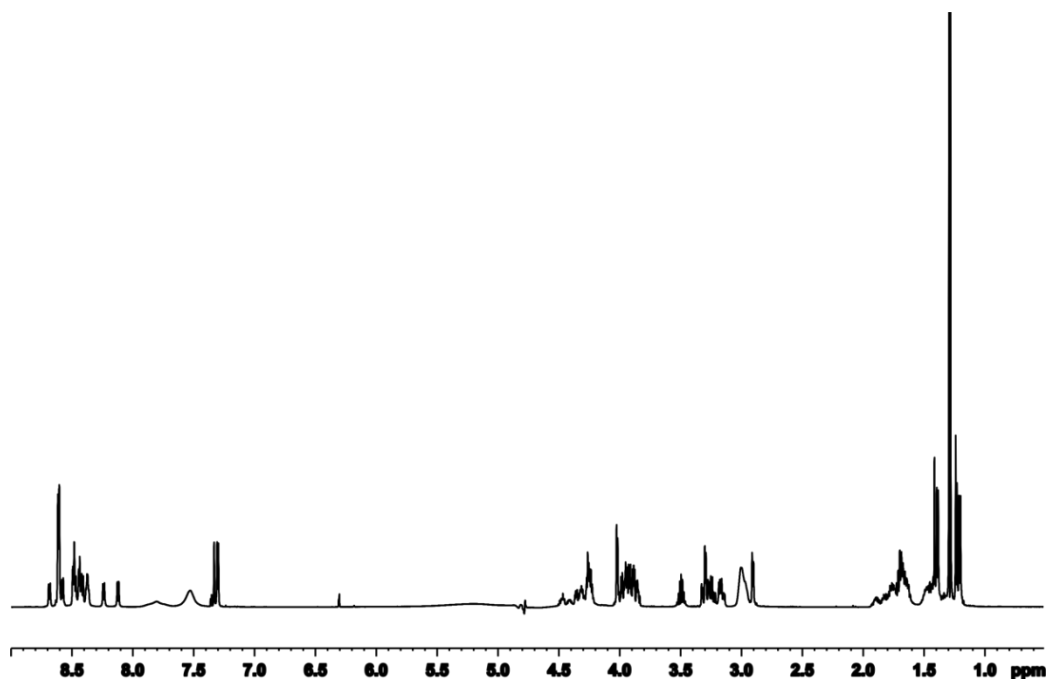
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 17 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 2.34 min, Reinheit 98%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 6.62 min, Reinheit 69%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
für C₅₇H₉₅N₂₁O₁₈S₃⁺ (M⁺) ber.: 1458.7071, gef.: 1458.7078.

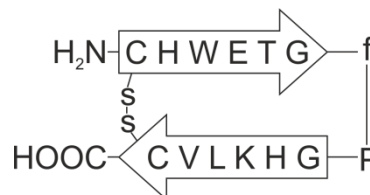
¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
1.60 mg in 600 µL:



9.6.21 Synthese von Peptid P21

[dsb^{1,14}] H-CHWETGfPGHKLVC-OH

C₇₃H₁₀₂N₂₀O₁₈S₂ [1611.86]



Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 7.6 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 7.52$ min, Reinheit 100%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 16.1$ min, Reinheit 93%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₇₃H₁₀₃N₂₀O₁₈S₃⁺ (M-H⁺) ber.: 1611.7195, gef.: 1611.7189.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 1.60 mg in 600 µL:

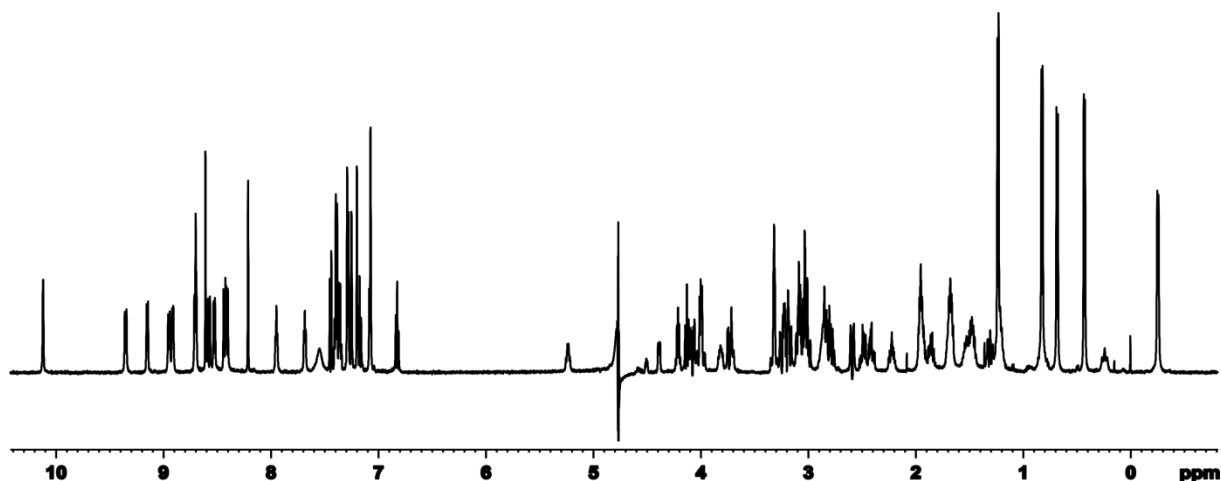


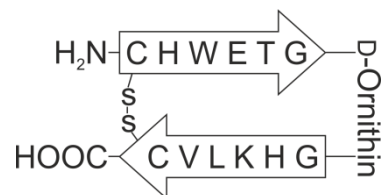
Tabelle 9-11: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P21**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	3.98	3.09, 2.60	-	-	-	-
His ²	d	9.16	4.87	3.32		δ^2 : 7.25	ϵ^1 : 8.63	
Trp ³	d	8.91	4.94	3.04	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.36	4.93	2.21, 1.95	2.46	-	-	-
Thr ⁵	d	9.25	4.83	4.25	1.18	-	-	-
Gly ⁶	t	7.95	3.99		-	-	-	-
phe ⁷	d	8.70	4.60	3.06				7.44 7.39 7.28
Pro ⁸	-	-	4.30	2.20, 2.05	2.01	3.50		-
Gly ⁹	d	7.68	4.08, 3.74		-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.40	5.25	3.25, 3.03	-	δ^2 : 7.24	ϵ^1 : 8.63	
Lys ¹¹	d	8.91	4.73	1.83, 1.69	1.37	1.37	2.89	-
Leu ¹²	d	8.52	3.81	1.35, 0.25	0.81	0.44, -0.25	-	-
Val ¹³	d	8.58	4.14	1.49	0.82, 0.72	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.43	4.58	3.20, 2.86	-	-	-	-

9.6.22 Synthese von Peptid P22

[dsb^{1,14}] H-CHWETGXGHKLVC-OH X = DSc

C₆₄H₉₆N₂₀O₁₇S₂ [1481.72]



Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 13 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 5.12$ min, Reinheit 99%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 9.31$ min, Reinheit 93%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₆₄H₉₈N₂₀O₁₇S₂²⁺ (M-2H⁺) ber.: 741.3429, gef.: 741.3425.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 1.80 mg in 600 µL:

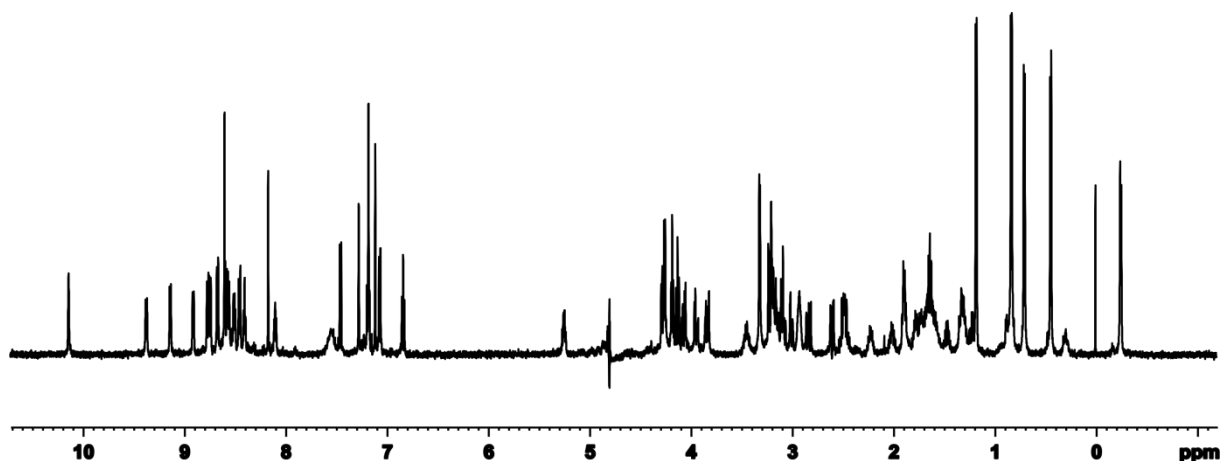


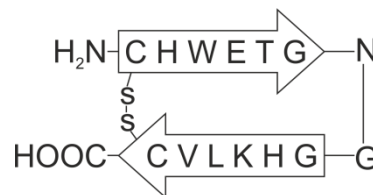
Tabelle 9-12: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P22**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	3.98	3.09, 2.60	-	-	-	-
His ²	d	9.12	4.91	3.32		δ^2 : 7.25	ϵ^1 : 8.63	
Trp ³	d	8.90	4.92	3.14, 3.02	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.38	4.87	2.11, 1.98	2.48	-	-	-
Thr ⁵	d	8.73	4.63	4.25	1.18	-	-	-
Gly ⁶	t	8.49	4.05, 3.95		-	-	-	-
DSc ^{7/8}		-	4.30	1.87	1.61	NH: 8.10, 3.43		-
Gly ⁹	t	8.4	4.04 3.94		-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.40	5.25	3.25, 3.03	-	δ^2 : 7.24	ϵ^1 : 8.63	
Lys ¹¹	d	8.76	4.71	1.76, 1.65	1.34	1.34	2.93	-
Leu ¹²	d	8.52	3.81	1.30, 0.31	0.75	0.44, -0.23	-	-
Val ¹³	d	8.59	4.14	1.49	0.82, 0.69	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.44	4.64	3.20, 2.85	-	-	-	-

9.6.23 Synthese von Peptid P23

[dsb^{1,14}] H-CHWETGNGGHKLVC-OH

C₆₅H₉₅N₂₁O₁₉S₂ [1538.72]



Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 14 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 5.37 min, Reinheit 100%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 10.4 min, Reinheit 88%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₆₅H₉₆N₂₂O₁₉S₂⁺ (M-H⁺) ber.: 1538.6627, gef.: 1538.6632.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.10 mg in 600 µL:

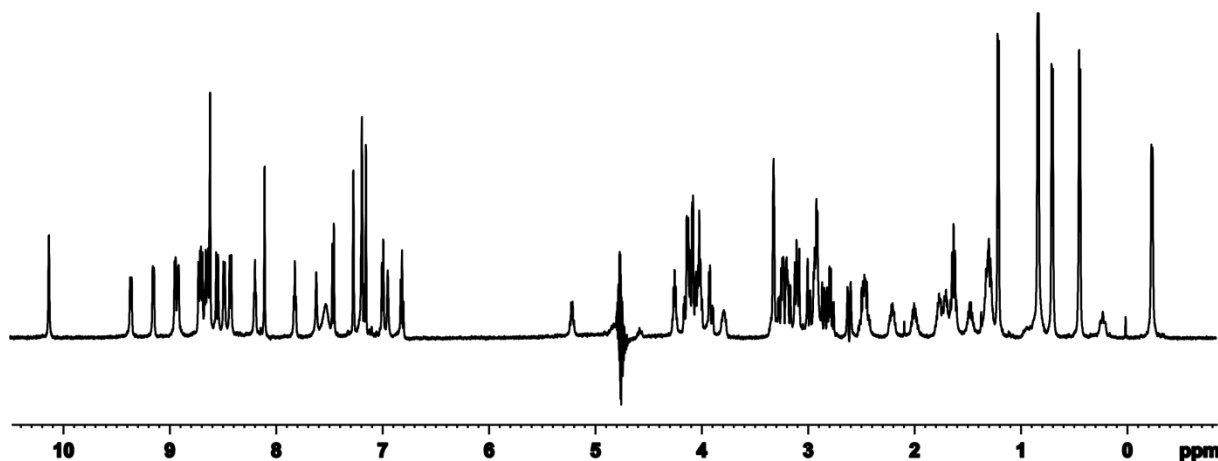


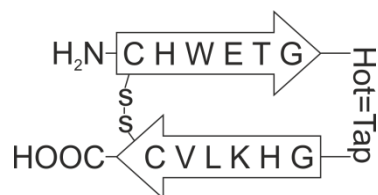
Tabelle 9-13: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P23**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM P hosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	4.00	3.15, 2.60	-	-	-	-
His ²	d	9.14	4.87	3.30		δ^2 : 7.25	ϵ^1 : 8.63	
Trp ³	d	8.90	4.92	3.13, 2.98	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.34	4.85	2.20, 1.98	2.46	-	-	-
Thr ⁵	d	8.68	4.72	4.24	1.18	-	-	-
Gly ⁶	t	8.19	4.10		-	-	-	-
Asn ⁷	d	8.93	4.59	3.06				
Gly ⁸	d	8.65	4.04, 3.89					-
Gly ⁹	d	7.89	4.03		-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.40	5.25	3.25, 3.03	-	δ^2 : 7.24	ϵ^1 : 8.63	
Lys ¹¹	d	8.72	4.71	1.77, 1.69	1.35	1.35	2.92	-
Leu ¹²	d	8.47	3.78	1.33, 0.23	0.83	0.42, -0.24	-	-
Val ¹³	d	8.54	4.12	1.48	0.83, 0.71	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.41	4.62	3.19, 2.88	-	-	-	-

9.6.24 Synthese von Peptid P24

[dsb^{1,14}] H-CHWETGHot=TapGHKLVC-OH

C₆₇H₉₆N₂₀O₂₀S₃ [1597.81]



Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 18 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 5.62 min, Reinheit 96%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 10.9 min, Reinheit 71%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₆₅H₉₆N₂₂O₁₉S₂⁺ (M-H⁺) ber.: 1597.8111, gef.: 1597.8104.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.40 mg in 600 µL:

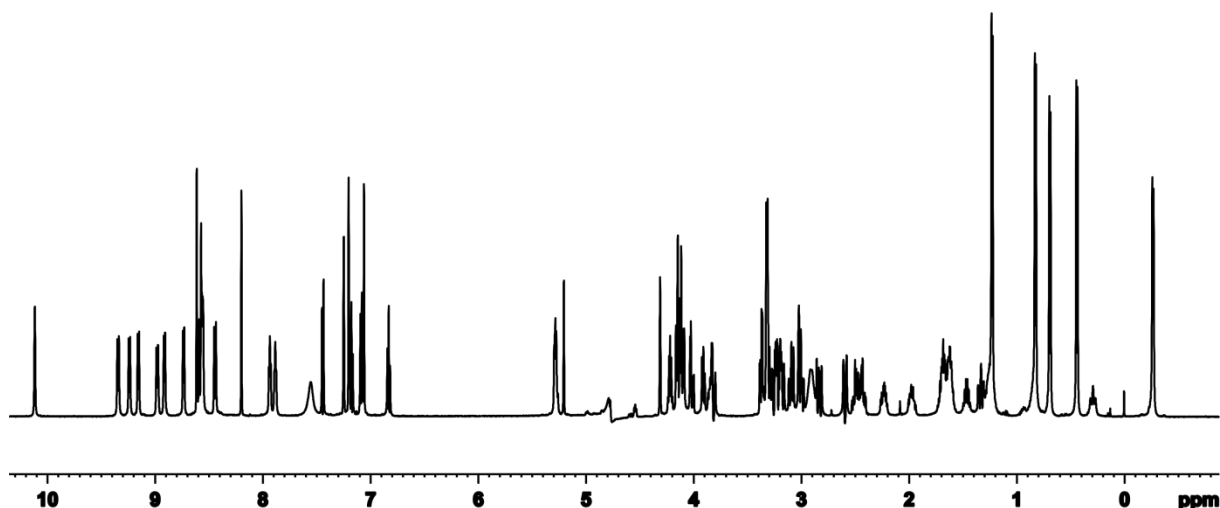


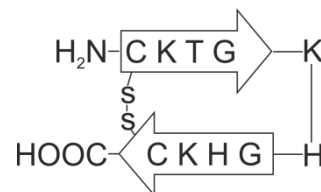
Tabelle 9-14: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P24**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	3.99	3.12, 2.60	-	-	-	-
His ²	d	9.15	4.86	3.30		δ^2 : 7.23	ϵ^1 : 8.62	
Trp ³	d	8.91	5.01	3.10 3.01	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.35	4.93	2.20, 1.97	2.45	-	-	-
Thr ⁵	d	8.73	4.54	4.23	1.22	-	-	-
Gly ⁶	t	7.93	4.13, 3.82		-	-	-	-
Hot=Tap ^{7/8}	d	9.25						6-H: 3.64, 7-H: 4.25, 8-H: 4.22, 8a-H: 5.10, 3-H: 5.27, 2-H: 3.37, 3.20
Gly ⁹	t	7.88	4.09		-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.56	5.29	3.24, 3.03	-	δ^2 : 7.24	ϵ^1 : 8.63	
Lys ¹¹	d	8.98	4.72	1.68	1.26	1.26	2.93	-
Leu ¹²	d	8.55	3.84	1.33, 0.28	0.82	0.46, -0.26	-	-
Val ¹³	d	8.58	4.11	1.46	0.84, 0.71	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.44	4.60	3.16, 2.88	-	-	-	-

9.6.25 Synthese von Peptid P25

[dsb^{1,10}] H-CKTGKHGHKC-OH

C₄₄H₇₃N₁₇O₁₂S₃ [1096.30]



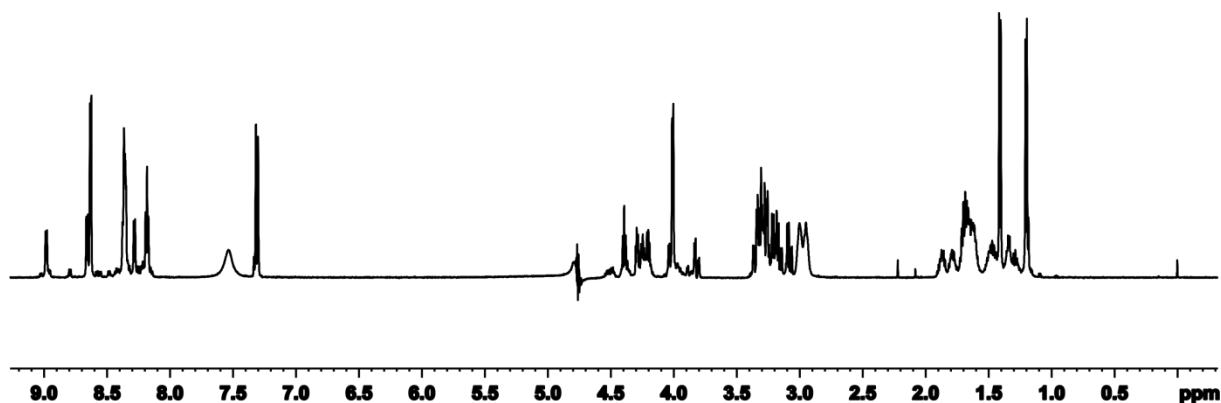
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 11 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 0.88$ min, Reinheit 98%.

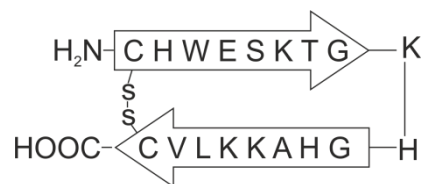
Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 10.0$ min, Reinheit 62%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₄₄H₇₃N₁₇O₁₂S₃⁺ (M⁺) ber.: 1096.3031, gef.: 1096.3033.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.20 mg in 600 µL:



9.6.26 Synthese von Peptid P26

[dsb^{1,18}] H-CHWESKTGKHHGAKKLVC-OHC₈₉H₁₃₉N₂₉O₂₃S₂ [2047.39]

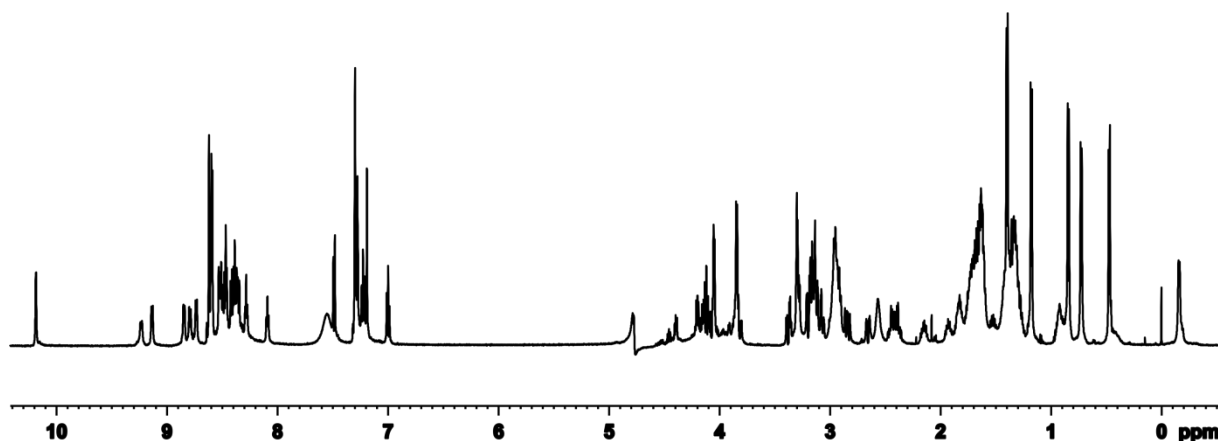
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 12 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 5.07 min, Reinheit 99%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 8.38 min, Reinheit 66%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₈₉H₁₃₉N₂₉O₂₃S₂⁺ (M⁺) ber.: 2047.3909, gef.: 2047.3912.

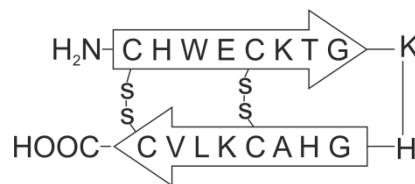
¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.10 mg in 600 µL:



9.6.27 Synthese von Peptid P27

[dsb^{1,18}][dsb^{5,14}] H-CHWECKTGKHHACKLVC-OH

C₈₆H₁₃₀N₂₈O₂₂S₄ [2036.40]



Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 10 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 5.89$ min, Reinheit 100%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 10.5$ min, Reinheit 92%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₈₆H₁₃₂N₂₈O₂₂S₄²⁺ (M-2H²⁺) ber.: 1019.4488, gef.: 1019.4504.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 1.90 mg in 600 µL:

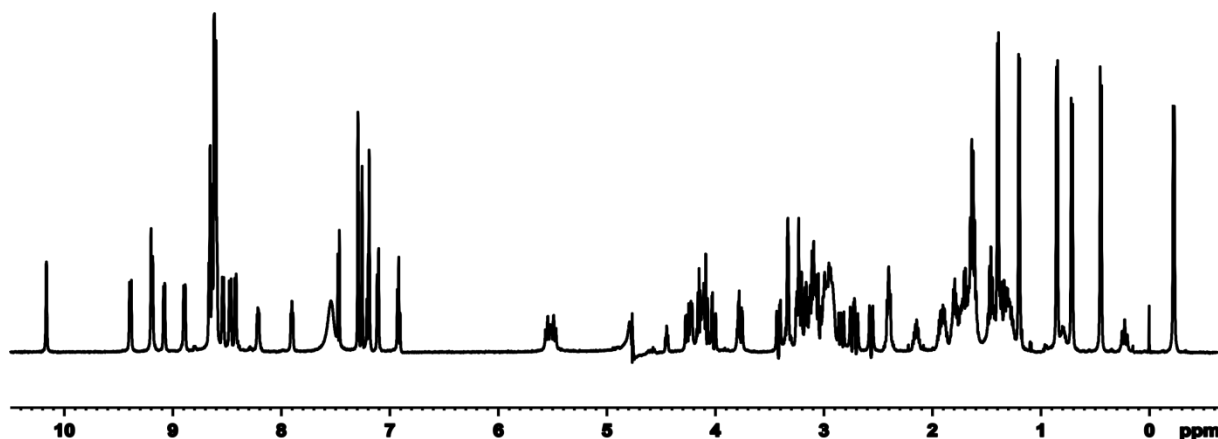


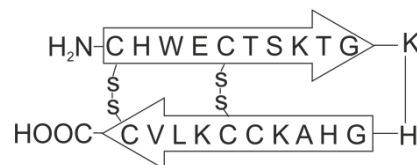
Tabelle 9-15: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P27**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	4.02	3.21, 2.60	-	-	-	-
His ²	d	9.19	4.88	3.35		δ^2 : 7.32	ϵ^1 : 8.60	
Trp ³	d	9.07	4.88	3.09	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.38	4.87	2.13, 1.90	2.39	-	-	-
Cys ⁵	d	9.19	5.48	3.04, 2.69				
Lys ⁶	d	8.62	4.62	1.79	1.45	1.31	2.95	
Thr ⁷	d	8.58	4.85	4.43	1.20	-	-	-
Gly ⁸	t	8.21	4.23, 4.00				-	-
Lys ⁹	d	8.58	4.60	1.75	1.40	1.31	2.93	
His ¹⁰	D	8.65	4.09	3.05		δ^2 : 7.24	ϵ^1 : 8.58	
Gly ¹¹	t	7.90	4.24		-	-	-	-
His ¹²	d	8.56	5.29	3.24, 3.03	-	δ^2 : 7.24	ϵ^1 : 8.63	
Ala ¹³	d	8.56	4.56	1.39				
Cys ¹⁴	D	8.60	4.42	3.42, 3.09				
Lys ¹⁵	d	8.89	4.68	1.77	1.64	1.34	2.91	-
Leu ¹⁶	d	8.54	3.77	1.34, 0.25	0.78	0.45, -0.22	-	-
Val ¹⁷	d	8.64	4.11	1.44	0.84, 0.66	-	-	-
Cys ¹⁸	d	8.47	4.58	3.23, 2.84	-	-	-	-

9.6.28 Synthese von Peptid P28

[dsb^{1,22}][dsb^{5,18}] H-CHWECTSKTGKHGHAKCCLVC-OH

C₁₀₂H₁₅₉N₃₃O₂₈S₅ [2455.90]



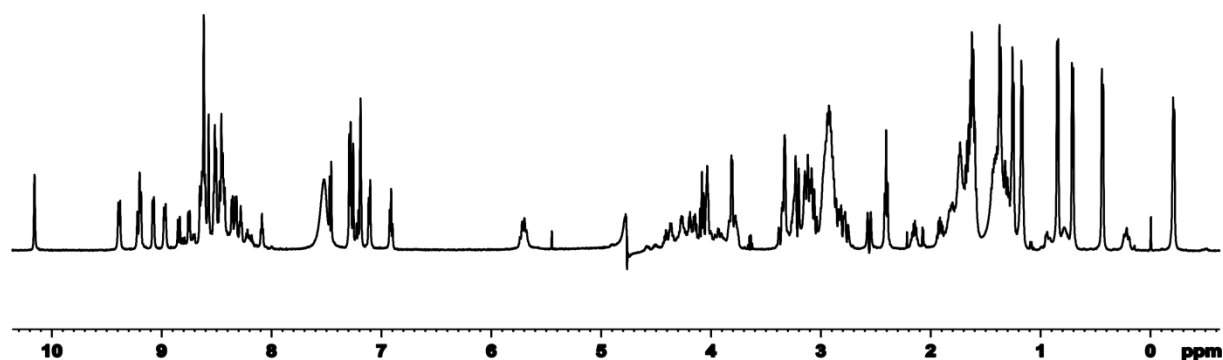
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 11 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 5.77$ min, Reinheit 100%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 11.2$ min, Reinheit 51%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₁₀₂H₁₆₂N₃₃O₂₈S₅³⁺ (M-3H³⁺) ber.: 819.3627, gef.: 819.3633.

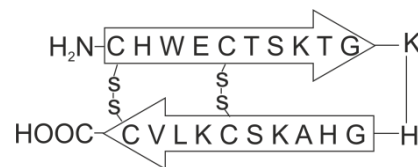
¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 1.40 mg in 600 µL:



9.6.29 Synthese von Peptid P29

[dsb^{1,22}][dsb^{5,18}] H-CHWECTSKTGKHGHAKSCLVC-OH

C₁₀₂H₁₅₉N₃₃O₂₉S₄ [2455.90]



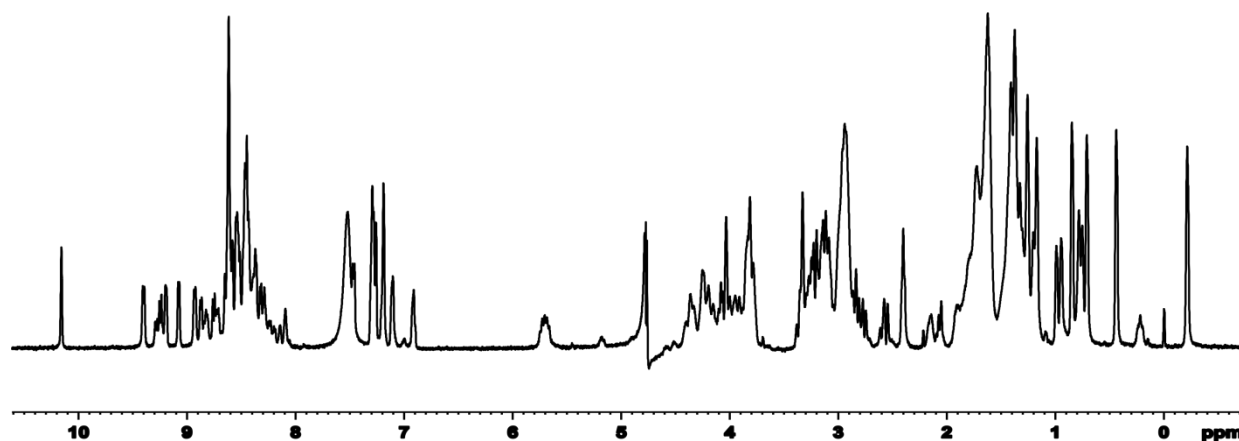
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 10 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 5.65$ min, Reinheit 100%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 11.0$ min, Reinheit 98%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₁₀₂H₁₆₂N₃₃O₂₉S₄³⁺ (M-3H³⁺) ber.: 814.3707, gef.: 814.3718.

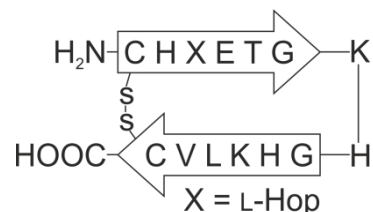
¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 1.50 mg in 600 µL:



9.6.30 Synthese von Peptid P30

[dsb^{1,14}] H-CHXETGKHGHKLVC-OH X = Hop

C₆₈H₁₀₃N₂₃O₂₀S₂ [1626.83]



Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt, wobei die enantiomerenreine Aminosäure Fmoc-L-Hop(tBu)-OH **51** verwendet wurde. Nach Abspaltung vom Harz konnte NMR-spektroskopisch festgestellt werden, dass die *t*Bu-Schutzgruppe des Pyridons unvollständig abgespalten war. Daher wurde das Peptid über Nacht in reiner TFA gerührt und erneut gefriergetrocknet. Anschließend wurde das Peptid gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 16 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 1.19$ min, Reinheit 98%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 6.36$ min, Reinheit 77%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₆₈H₁₀₃N₂₃O₂₀S₂²⁺ (M²⁺) ber.: 812.8595, gef.: 812.8599.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 1.70 mg in 600 µL:

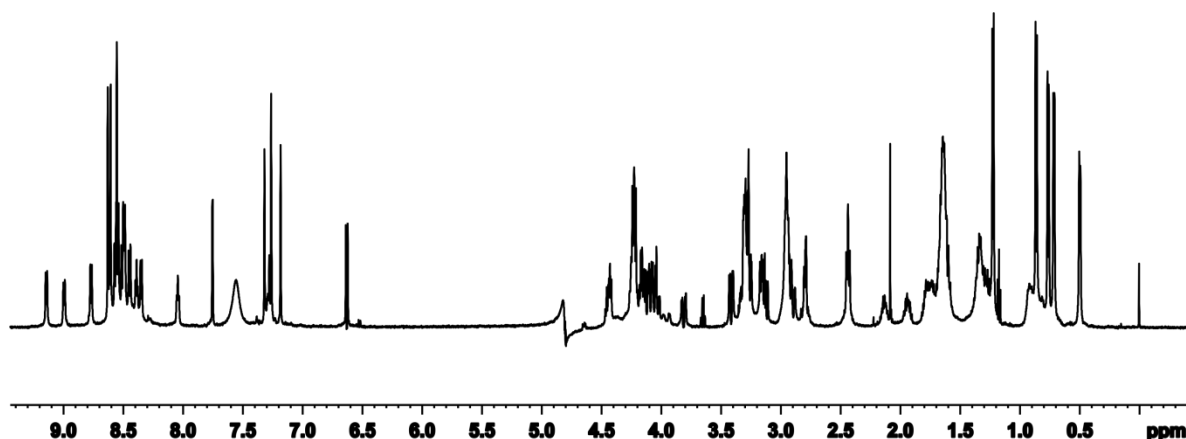


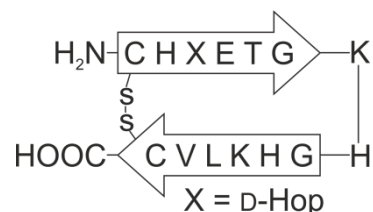
Tabelle 9-16: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P30**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	3.99	3.00, 2.51		-	-	-
His ²	d	9.15	4.88	3.28		δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	
Hop ³	d	8.98	4.82	2.77	-			H-6: 7.75 H-4: 7.27 H-3: 6.62
Glu ⁴	d	8.76	4.61	2.12, 1.93	2.41	-	-	-
Thr ⁵	d	8.50	4.42	4.21	1.22	-	-	-
Gly ⁶	t	8.38	4.04		-	-	-	-
Lys ⁷	d	8.49	4.21	1.64	1.26	1.26		
His ⁸	D	8.56	4.74	3.39, 3.12		δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Gly ⁹	t	8.38	4.04		-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.48	4.90	3.26, 3.14	-	δ^2 : 7.19	ϵ^1 : 8.58	
Lys ¹¹	d	8.35	4.43	1.71	1.29	1.29	2.91	-
Leu ¹²	d	8.54	4.21	0.82	1.57	0.86, 0.49	-	-
Val ¹³	d	8.53	4.13	1.47	0.84, 0.73	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.44	4.59	3.23, 2.91	-	-	-	-

9.6.31 Synthese von Peptid P31

[dsb^{1,14}] H-CHXETGKHGHKLVC-OH X = hop

C₆₈H₁₀₃N₂₃O₂₀S₂ [1626.83]



Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt, wobei die racemische Aminosäure Fmoc-L-Hop(*t*Bu)-OH **50** verwendet wurde. Nach Abspaltung vom Harz konnte NMR-spektroskopisch festgestellt werden, dass die *t*Bu-Schutzgruppe des Pyridons unvollständig abgespalten war. Daher wurde das Peptid über Nacht in reiner TFA gerührt und erneut gefriergetrocknet. Anschließend wurde das Peptid gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Die diastereomeren Peptide wurden mittels Semiprep-HPLC aufgetrennt. Nach Aufreinigung wurden 7.5 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

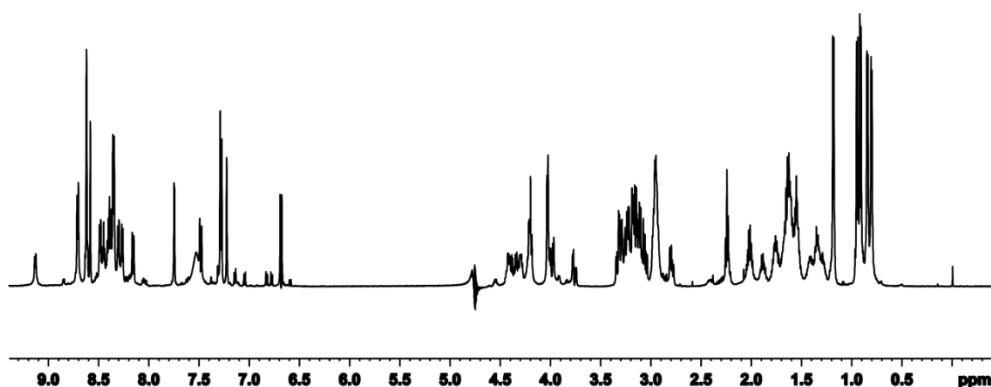
Analytik für das D-Hop Peptid:

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 1.28$ min, Reinheit 96%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 7.53$ min, Reinheit 37%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₆₈H₁₀₃N₂₃O₂₀S₂²⁺ (M²⁺) ber.: 812.8595, gef.: 812.8599.

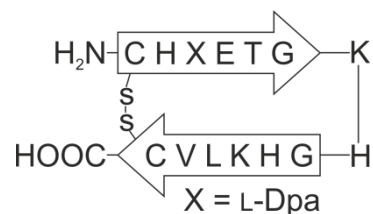
¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 1.20 mg in 600 µL:



9.6.32 Synthese von Peptid P32

[dsb^{1,14}] H-CHXETGKHHGKLVC-OH X = Dpa

C₇₅H₁₀₈N₂₂O₁₈S₂ [1669.95]



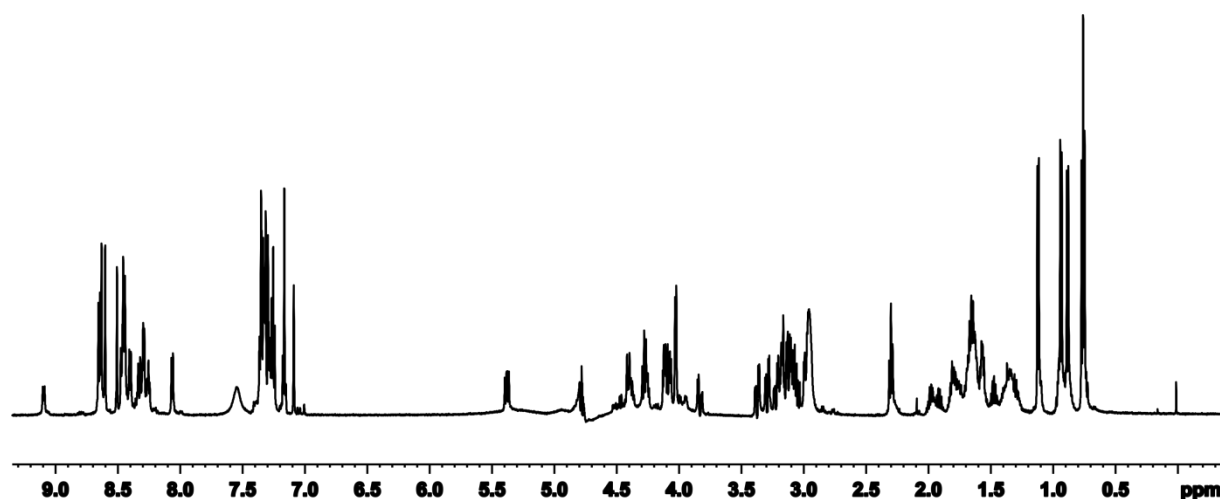
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 17 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 8.22 min, Reinheit 93%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 14.5 min, Reinheit 74%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₇₅H₁₀₈N₂₂O₁₈S₂²⁺ (M²⁺) ber.: 834.3826, gef.: 834.3828.

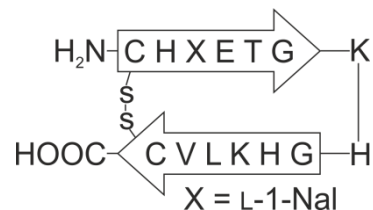
¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 1.60 mg in 600 µL:



9.6.33 Synthese von Peptid P33

[dsb^{1,14}] H-CHXETGKHHGKLVC-OH X = 1-Nal

C₇₃H₁₀₆N₂₂O₁₈S₂ [1643.91]



Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 21 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 6.63 min, Reinheit 99%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 12.7 min, Reinheit 69%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 für C₇₃H₁₀₆N₂₂O₁₈S₂³⁺ (M²⁺) ber.: 821.9535, gef.: 821.9545.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 1.80 mg in 600 µL:

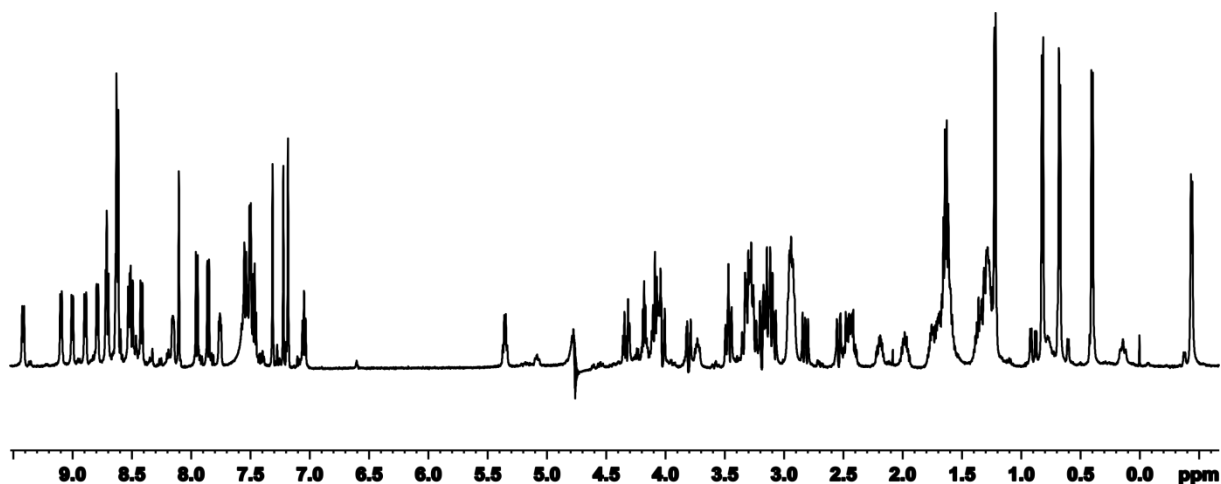


Tabelle 9-17: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P33**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Cys ¹	-	-	n.v.	3.00, 2.51		-	-	-
His ²	d	9.09	4.85	3.29		δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	
L-Nal ³	d	8.86	5.08	3.48, 3.26	-			H-8: 7.55 H-7: 7.05 H-6: 7.50 H-5: 7.95 H-4: 7.85 H-3: 7.46 H-2: 7.50
Glu ⁴	d	8.89	4.89	2.46, 1.89	2.20	-	-	-
Thr ⁵	d	8.78	4.60	4.19	1.23	-	-	-
Gly ⁶	dd	8.16	4.32, 4.03		-	-	-	-
Lys ⁷	d	8.71	4.04	1.63	1.27	1.26		
His ⁸	d	8.64	4.83	3.43, 3.08		δ^2 : 7.22	ϵ^1 : 8.63	
Gly ⁹	dd	7.75	3.43, 3.08		-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.69	5.35	3.29, 3.15	-	δ^2 : 7.22	ϵ^1 : 8.63	
Lys ¹¹	d	8.86	4.72	1.71	1.29	1.29	2.91	-
Leu ¹²	d	8.52	3.70	1.25, 0.05	0.79	0.42, -0.44	-	-
Val ¹³	d	8.50	4.10	1.37	0.81, 0.68	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.41	4.59	3.20, 2.85	-	-	-	-

9.6.34 Synthese von Peptid P34

[dsb^{4,17}] Ac-K(FITC)KKCHWETGKHHGHLVC-OH

C₁₁₂H₁₅₆N₃₀O₂₇S₃ [2448.83]

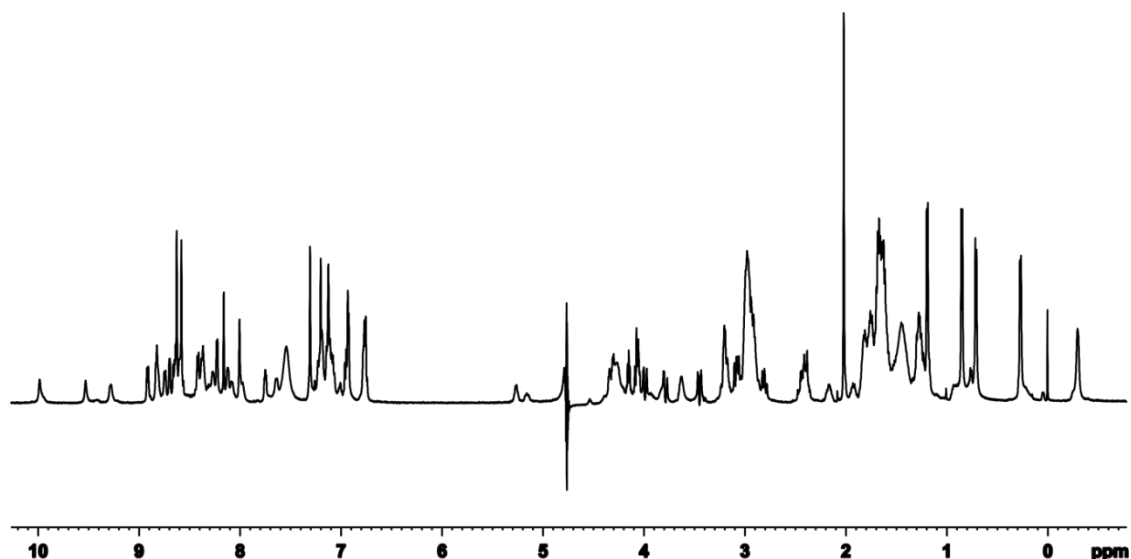
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt. K¹ wurde dabei als Fmoc-L-Lys(Dde)-OH eingesetzt. Der *N*-Terminus wurde mit 50 eq Ac₂O und 10 eq DIPEA in 5 mL DCM für 60 Minuten acetyliert, bevor die Dde-Schutzgruppe mit 2% N₂H₄ in DMF zweifach in je 30 Minuten abgespalten wurde. FITC-Labeling erfolgte mit 5.0 eq FITC und 10 eq DIPEA in DCM über Nacht. Anschließend wurde das Peptid vom Harz abgespalten und gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift oxidiert. Nach Aufreinigung mittels Semiprep-HPLC konnte NMR-spektroskopisch ein Labelling von ca. 40% festgestellt werden. Nach Aufreinigung wurden 3.4 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 8.01 min, Reinheit 95%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 18.4 min, Reinheit 71%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
für C₁₁₂H₁₅₆N₃₀O₂₇S₃²⁺ (M²⁺) ber.: 1224.4242, gef.: 1224.4256.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
1.10 mg in 600 µL:



9.6.35 Synthese von Peptid P35

[dsb^{4,17}] Levofloxacin-KKCHWETGKHGHKLVC-OH

C₁₀₉H₁₆₁N₃₂O₂₅S₂F [2402.80]

Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt. Nach Abschluss der automatisierten Peptidsynthese wurde kommerziell erhältliches Levofloxacin unter manuellen Kupplungsbedingungen (5 eq Levofloxacin, 5.0 eq HOAt, 5.0 eq HATU, 10 eq DIPEA) in DMF über Nacht manuell an den *N*-Terminus gekuppelt. Abspaltung und Oxidation erfolgten gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift. Nach Aufreinigung wurden 21 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 6.00 min, Reinheit 100%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 8.98 min, Reinheit 92%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
C₁₀₉H₁₆₁N₃₂O₂₅S₂F²⁺ (M²⁺) ber.: 1201.3543, gef.: 1201.3540.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
2.10 mg in 600 µL:

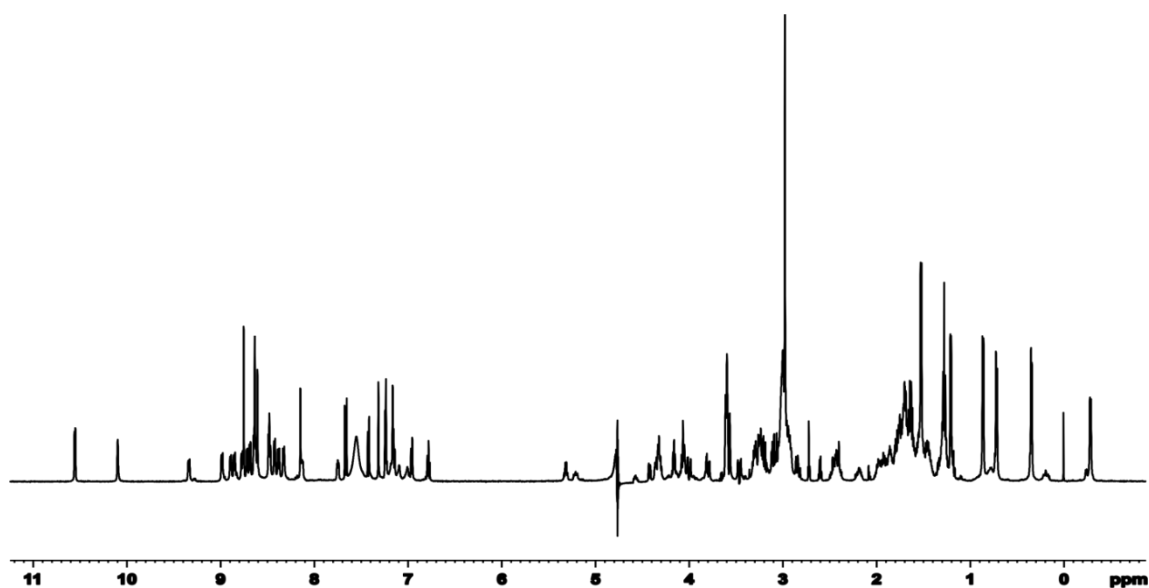
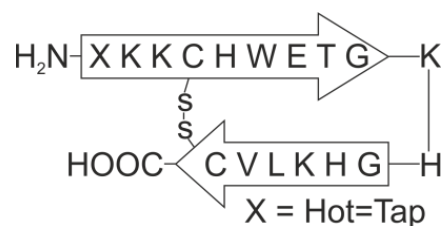


Tabelle 9-18: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P35**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Levofloxacin								5-H: 8.69 8-H: 7.66 2-H: 4.50 3-H: 4.39 N-CH ₃ : 2.97 3-H: 1.53*
Lys ¹	d	10.6	4.56	1.91	1.75	1.41		
Lys ²	d	8.47	4.29	1.80	1.70	1.46		
Lys ³	d	8.45	4.37	1.80	1.70	1.46		
Cys ⁴	d	8.32-	4.72	3.01, 2.41		-	-	-
His ⁵	d	8.97	4.87	3.30		δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	
Trp ⁶	d	8.88	4.92	3.14	-			
Glu ⁷	d	9.35	4.84	2.42, 1.92	2.17	-	-	-
Thr ⁸	d	8.12	4.57	4.16	1.21	-	-	-
Gly ⁹	dd	8.12	4.33, 4.00		-	-	-	-
Lys ¹⁰	d	8.70	4.07	1.63	1.27	1.26		
His ¹¹	d	8.63	4.82	3.25, 3.10		δ^2 : 7.22	ϵ^1 : 8.68	
Gly ¹²	dd	7.74	4.33, 3.78		-	-	-	-
His ¹³	d	8.68	5.28	3.48, 3.10	-	δ^2 : 7.22	ϵ^1 : 8.63	
Lys ¹⁴	d	8.84	4.73	1.73	1.31	1.29	2.95	-
Leu ¹⁵	d	8.46	3.70	1.28, 0.18	0.77	0.34, -0.30	-	-
Val ¹⁶	d	8.62	4.04	1.52	0.86, 0.69	-	-	-
Cys ¹⁷	d	8.38	4.71	3.00, 2.84	-	-	-	-

*Signale der 1,4-Piperazin-Methylengruppen sind bei pH 3 nicht sichtbar

9.6.36 Synthese von Peptid P36

[dsb^{5,18}] H-Hot=TapKKCHWETGK-H $C_{91}H_{140}N_{29}O_{24}S_3$ [2120.48]

Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 17 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 $t_r = 5.02$ min, Reinheit 100%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $t_r = 8.57$ min, Reinheit 93%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 $C_{91}H_{141}N_{29}O_{24}S_3^{3+}$ (M-H³⁺) ber.: 707.3317, gef.: 707.3318.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.20 mg in 600 µL:

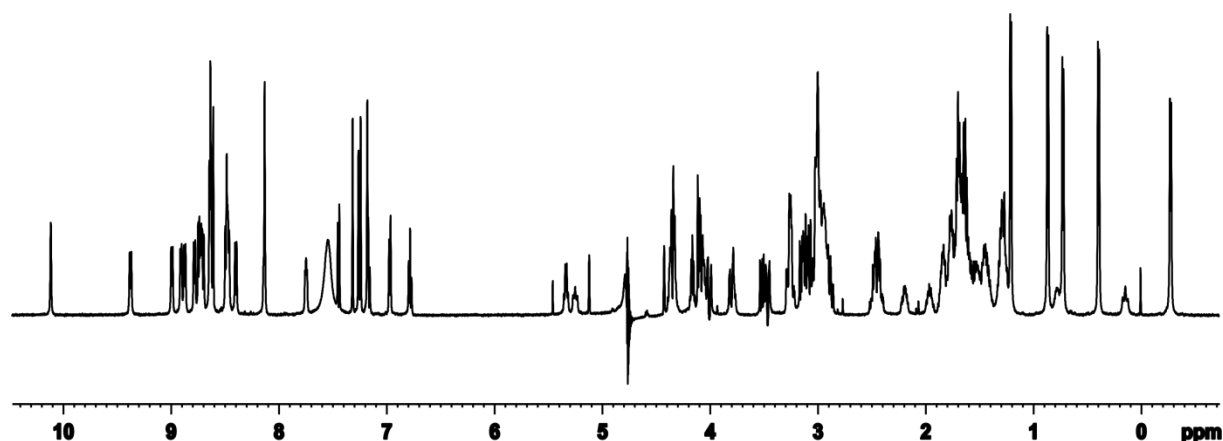


Tabelle 9-19: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P36**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Hot=Tap ^{1/2}	-							6-H: 3.55 7-H: 4.00 8-H: 4.30 8a-H: 5.25 3-H: 5.38 2-H: 3.28, 3.00
Lys ³	d	8.74	4.32	1.78	1.52	1.32		
Lys ⁴	d	8.49	4.36	1.74	1.50	1.42	2.95	
Cys ⁵	d	8.39	5.25	3.00, 2.45		-	-	-
His ⁶	d	8.99	4.85	3.25		δ^2 : 7.31	ϵ^1 : 8.63	
Trp ⁷	d	8.90	4.90	3.08, 3.00	-			
Glu ⁸	d	9.37	4.87	2.44, 1.95	2.15	-	-	-
Thr ⁹	d	8.78	4.58	4.15	1.20	-	-	-
Gly ¹⁰	dd	8.13	4.34, 4.00		-	-	-	-
Lys ¹¹	d	8.72	4.05	1.53	1.50	1.27	2.88	
His ¹²	d	8.63	4.84	3.46, 3.07		δ^2 : 7.22	ϵ^1 : 8.68	
Gly ¹³	dd	7.74	4.34, 3.80		-	-	-	-
His ¹⁴	d	8.70	5.33	3.26, 3.12	-	δ^2 : 7.22	ϵ^1 : 8.63	
Lys ¹⁵	d	8.87	4.74	1.58	1.39	1.29	2.93	-
Leu ¹⁶	d	8.47	3.77	1.26, 0.13	0.76	0.39, -0.30	-	-
Val ¹⁷	d	8.62	4.08	1.54	0.86, 0.72	-	-	-
Cys ¹⁸	d	8.46	4.82	3.00, 2.82	-	-	-	-

9.6.37 Synthese von Peptid P37

[dsb^{1,13}] H-CHWETGHGHKLVC –OH ($\Delta X/K^7$ von **P2**)

C₆₅H₉₃N₂₁O₁₇S₂ [1504.71]

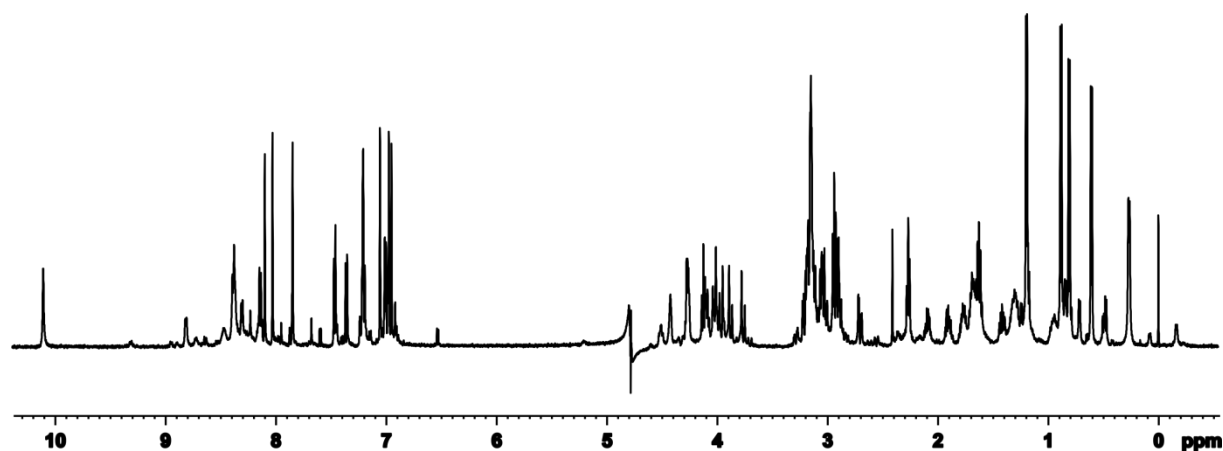
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese unter Verwendung von Fmoc-L-Mal-OH **103** im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 8.0 mg eines farblosen Feststoffs erhalten. Das Produkt konnte als die Delitionsmutante ΔK^7 identifiziert werden.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 5.67 min, Reinheit 95%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 11.2 min, Reinheit 78%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
für C₆₅H₉₃N₂₁O₁₇S₂²⁺ (M²⁺) ber.: 702.3531, gef.: 702.3538.

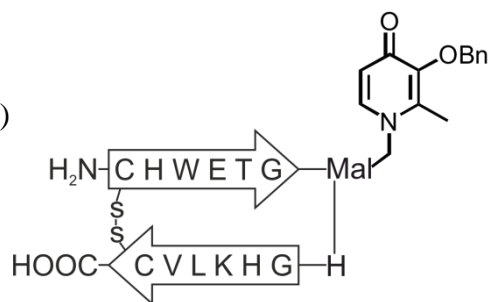
¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
1.60 mg in 600 μ L:



9.6.38 Synthese von Peptid P38

[dsb^{1,14}] H-CHWETGXHGHLVC –OH (X=Mal(Bn))

C₈₄H₁₁₅N₂₃O₂₀S₂ [1831.11]



Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese unter Verwendung von Fmoc-L-Mal(Bn)-OH **108** im 0.1 mM Maßstab dargestellt und anschließend gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 4.0 mg eines farblosen Feststoffs erhalten. Hydrogenolytische Abspaltung der benzyllischen Schutzgruppe führte zur Zersetzung des Peptids.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):

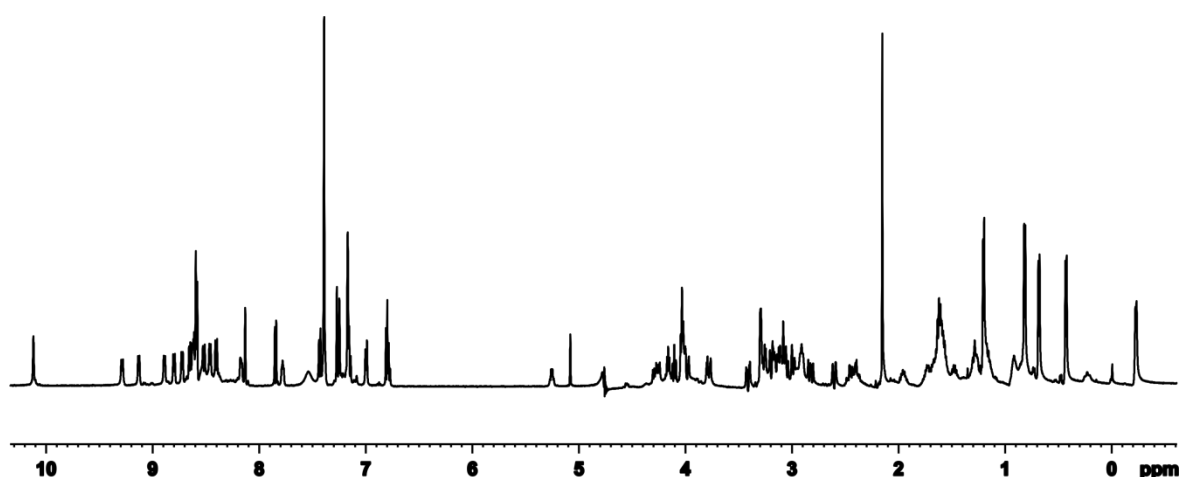
$t_r = 7.17$ min, Reinheit 95%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):

$t_r = 11.5$ min, Reinheit 75%.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):

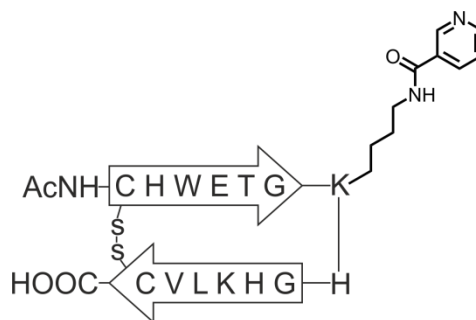
1.60 mg in 600 µL:



9.6.39 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Seitenketten-Modifizierung von K⁷ an der festen Phase

Das Peptid wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt, wobei Lys⁷, falls nicht anders erwähnt, als Fmoc-L-Lys(Dde)-OH eingesetzt wurde. Nach Abschluss der automatisierten Peptidsynthese wurde der *N*-Terminus mit Ac₂O (50 eq) und DIPEA (5 eq) in DCM für 60 Minuten acetyliert. Die Dde-Schutzgruppe von Lys⁷ wurde mit 2% N₂H₄ in DMF zweifach für je 30 Minuten abgespalten. Die Acylierung des primären Amins erfolgte mit jeweils 3 eq der entsprechenden Carbonsäure, HOBt, HBTU und 10 eq DIPEA in DMF für 60 Minuten. Nach mehrmaligem Waschen mit DMF, DCM und MeOH wurde das Peptid unter Standardbedingungen vom Harz abgespalten.

9.6.40 Synthese von Peptid P39

[dsb^{1,14}] Ac-CHWETGK(NA)HGHLVC-OHC₇₉H₁₀₉N₂₄O₂₀S₂ [1779.01]

Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und die Seitenkette von Lys⁷ wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift mit Nikotinsäure modifiziert. Anschließend wurde das Peptid entsprechend der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 11 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):

t_r = 6.95 min, Reinheit 95%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):

t_r = 13.1 min, Reinheit 92%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):

C₇₉H₁₀₉N₂₄O₂₀S₂⁺ (M⁺) ber.: 1777.7739, gef.: 1777.7728.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):

1.60 mg in 600 µL:

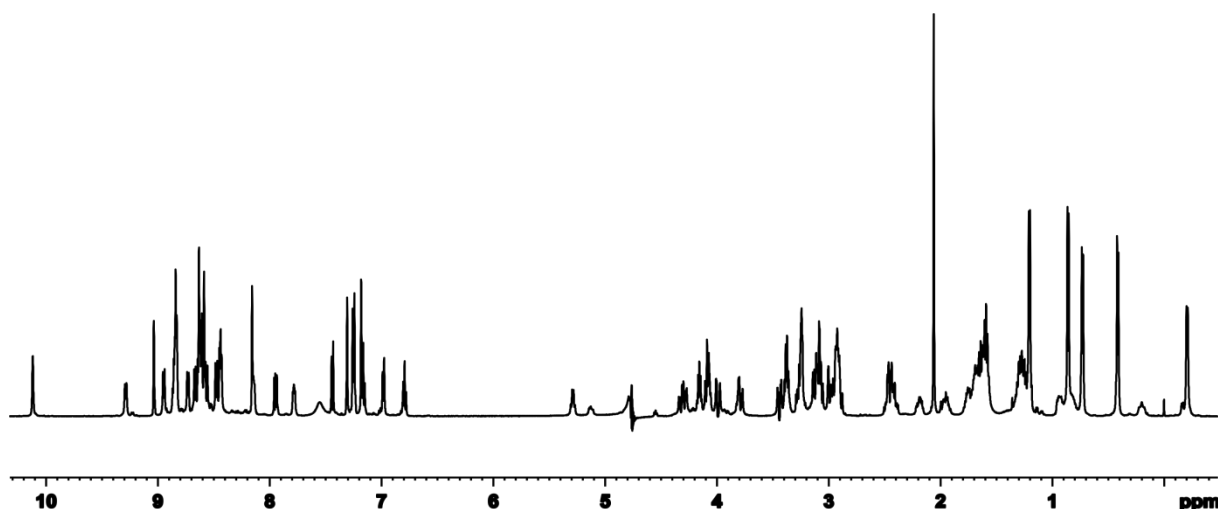
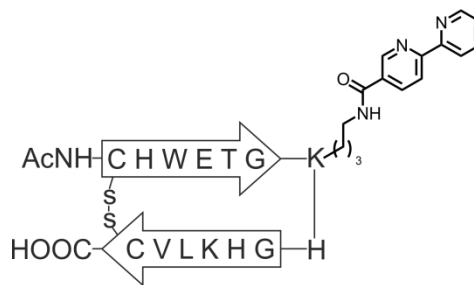


Tabelle 9-20: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P39**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Ac-Cys ¹	d	8.44	5.11	2.94, 2.45		-	-	Ac-CH ₃ : 2.06
His ²	d	8.95	4.83	3.25		δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Trp ³	d	8.85	4.85	3.36	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.28	4.85	2.18, 1.95	2.44	-	-	-
Thr ⁵	d	8.72	4.55	4.19	1.23	-	-	-
Gly ⁶	dd	8.14	4.18, 3.98		-	-	-	-
Lys ⁷ (NA)	d	8.61	4.00	1.63	1.27	1.26	NH: 8.60 CH ₂ : 3.11	H-2: 9.03 H-4: 8.62 H-5: 7.94 H-6: 8.59
His ⁸	d	8.64	4.83	3.43, 3.08		δ^2 : 7.22	ϵ^1 : 8.63	
Gly ⁹	dd	7.75	4.43, 3.08		-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.46	4.80	3.09, 3.00	-	δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.63	
Lys ¹¹	d	8.83	4.80	1.71	1.29	1.29	2.95	-
Leu ¹²	d	8.43	3.81	1.27, 0.18	0.83	0.41, -0.20	-	-
Val ¹³	d	8.56	4.09	1.59	0.85, 0.73	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.64	4.80	3.27, 3.12	-	-	-	-

9.6.41 Synthese von Peptid P40

[dsb^{1,14}] Ac-CHWETGK(BiPy)HGHLVC-OHC₈₄H₁₁₂N₂₅O₂₀S₂ [1856.10]

Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und die Seitenkette von Lys⁷ wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift mit **115** modifiziert. Anschließend wurde das Peptid entsprechend der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 14 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):

t_r = 6.75 min, Reinheit 100%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):

t_r = 13.2 min, Reinheit 84%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):

C₈₄H₁₁₂N₂₅O₂₀S₂⁺ (M⁺) ber.: 1854.9011, gef.: 1854.9019.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):

2.00 mg in 600 µL:

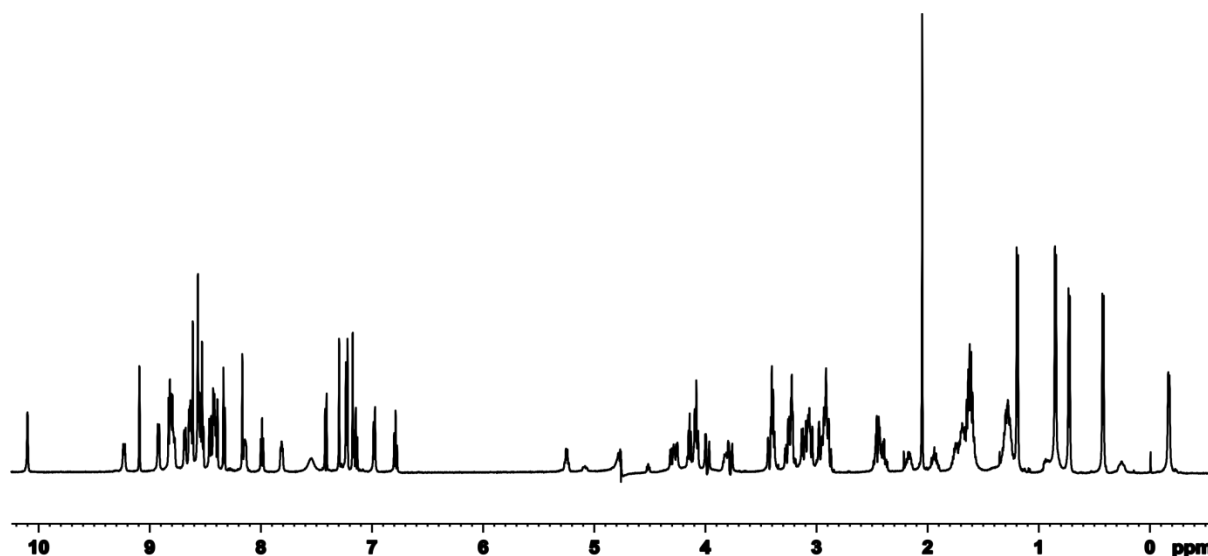
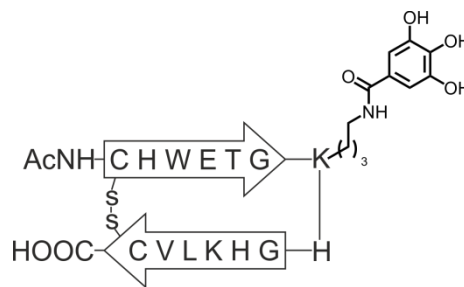


Tabelle 9-21: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P40**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Ac-Cys ¹	d	8.43	5.05	2.94, 2.45		-	-	Ac-CH ₃ : 2.04
His ²	d	8.92	4.86	3.20		δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Trp ³	d	8.79	4.79	3.34	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.23	4.78	2.18, 1.95	2.44	-	-	-
Thr ⁵	d	8.72	4.55	4.19	1.23	-	-	-
Gly ⁶	dd	8.14	4.27, 4.00		-	-	-	-
Lys ⁷ (BiPy)	d	8.61	4.00	1.63	1.27	1.26	NH: 8.63 CH ₂ : 3.21	H-3: 8.80 H-4: 8.32 H-5: 7.99 H-6: 8.53 H-3': 8.63 H-4': 8.65 H-6': 9.08
His ⁸	d	8.64	4.83	3.43, 3.08		δ^2 : 7.22	ϵ^1 : 8.63	
Gly ⁹	dd	7.81	4.34, 3.79		-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.46	4.80	3.09, 3.00	-	δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.63	
Lys ¹¹	d	8.83	4.80	1.71	1.29	1.29	2.95	-
Leu ¹²	d	8.43	3.81	1.27, 0.18	0.83	0.41, -0.20	-	-
Val ¹³	d	8.56	4.09	1.59	0.84, 0.72	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.64	4.80	3.27, 3.12	-	-	-	-

9.6.42 Synthese von Peptid P41

[dsb^{1,14}] Ac-CHWETGK(GA)HGHLVC-OHC₈₀H₁₁₀N₂₃O₂₃S₂ [1826.02]

Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und die Seitenkette von Lys⁷ wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift mit (TBS)₃-Gallussäure **117b** modifiziert. Anschließend wurde das Peptid entsprechend der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 13 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):

t_r = 6.68 min, Reinheit 100%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):

t_r = 13.6 min, Reinheit 84%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):

C₈₀H₁₁₀N₂₃O₂₃S₂⁺ (M⁺) ber.: 1826.0221, gef.: 1826.0229.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):

1.70 mg in 600 µL:

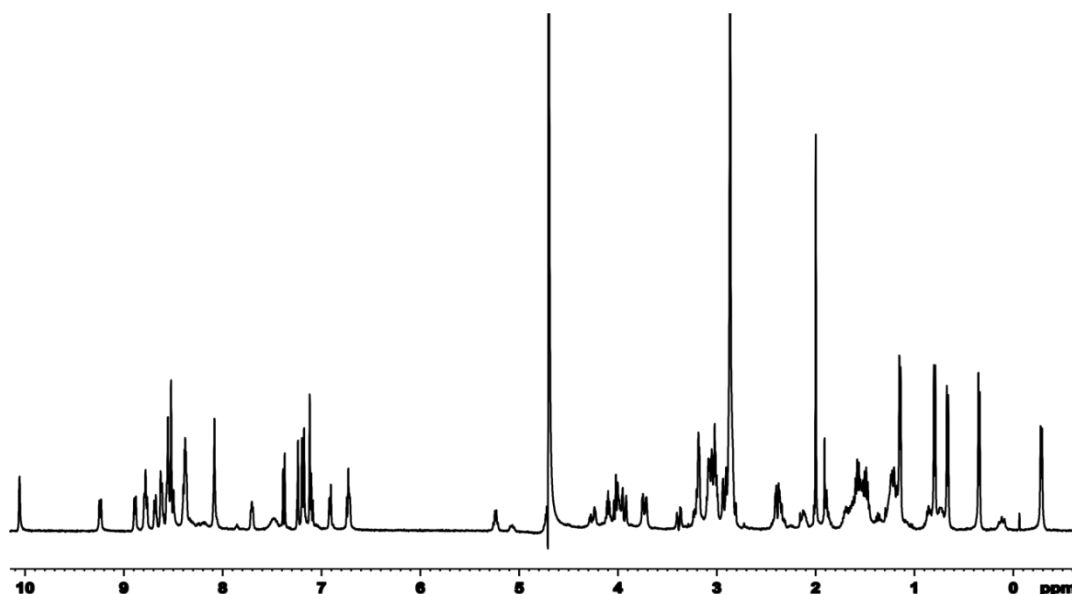
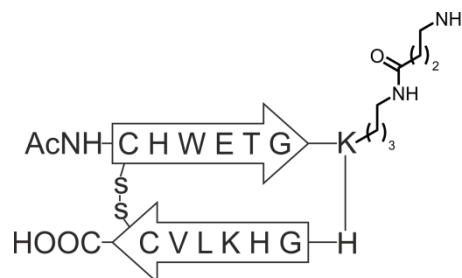


Tabelle 9-22: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P41**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Ac-Cys ¹	d	8.40	5.15	2.99, 2.50		-	-	Ac-CH ₃ : 2.06
His ²	d	8.95	4.88	3.25		δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Trp ³	d	8.84	4.84	3.34	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.30	4.78	2.18, 1.95	2.44	-	-	-
Thr ⁵	d	8.75	4.60	4.19	1.23	-	-	-
Gly ⁶	dd	8.15	4.29, 4.05		-	-	-	-
Lys ⁷ (GA)	d	8.64	4.10	1.63	1.27	1.26	NH: 8.57 CH ₂ : 3.05	CH: 8.55
His ⁸	d	8.69	4.88	3.50, 3.11		δ^2 : 7.22	ϵ^1 : 8.63	
Gly ⁹	dd	7.84	4.30, 3.75		-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.48	4.85	3.15, 3.09	-	δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.63	
Lys ¹¹	d	8.83	4.80	1.71	1.29	1.29	2.95	-
Leu ¹²	d	8.45	3.81	1.27, 0.18	0.83	0.42, -0.22	-	-
Val ¹³	d	8.60	4.11	1.63	0.84, 0.72	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.60	4.85	3.21, 3.10	-	-	-	-

9.6.43 Synthese von Peptid P42

[dsb^{1,14}] Ac-CHWETGK(GABA)HGHKLVC-OHC₇₇H₁₁₃N₂₄O₂₀S₂ [1759.02]

Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und die Seitenkette von Lys⁷ wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift mit Boc-GABA-OH modifiziert. Anschließend wurde das Peptid entsprechend der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 25 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 6.42 min, Reinheit 99%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 12.5 min, Reinheit 88%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 C₇₇H₁₁₃N₂₄O₂₀S₂⁺ (M⁺) ber.: 1757.8022, gef.: 1757.8025.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 2.10 mg in 600 µL:

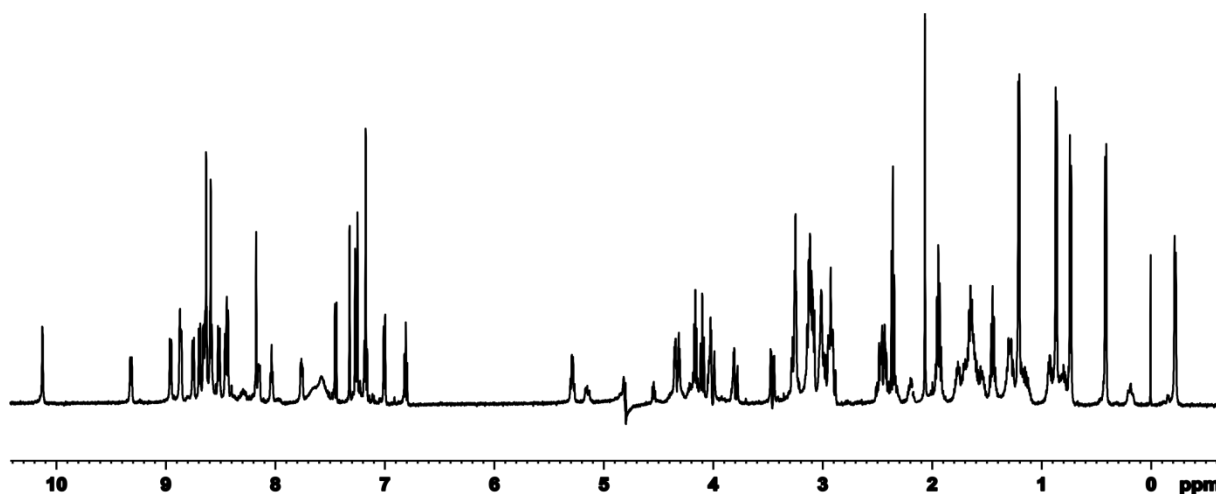
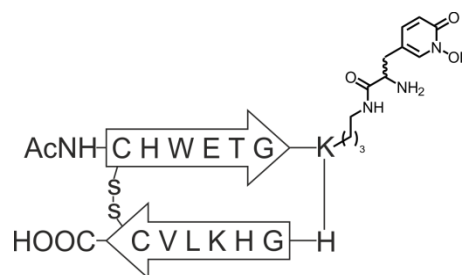


Tabelle 9-23: Chemische Verschiebungen der Protonen von Peptid **P42**, (aus TOCSY-, HSQC-Spektren, 600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 3.0)/D₂O 9:1).

AS	NH	$\delta(\text{NH})$	$\delta(\alpha)$	$\delta(\beta)$	$\delta(\gamma)$	$\delta(\delta)$	$\delta(\epsilon)$	Andere
Ac-Cys ¹	d	8.43	5.15	2.95, 2.45		-	-	Ac-CH ₃ : 2.07
His ²	d	8.96	4.86	3.23		δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.61	
Trp ³	d	8.86	4.87	3.31, 2.98	-	δ^1 : 7.25	ϵ^1 : 10.1 ϵ^3 : 7.18	ζ^2 : 7.45 ζ^3 : 6.79 η^2 : 6.96
Glu ⁴	d	9.31	4.83	2.22, 1.96	2.45	-	-	-
Thr ⁵	d	8.75	4.54	4.19	1.22	-	-	-
Gly ⁶	dd	8.15	4.32, 4.00		-	-	-	-
Lys ⁷ (GABA)	d	8.65	4.03	1.63	1.50	1.21	NH: 8.03 CH ₂ : 3.10	2-H: 1.44 3-H: 1.15 4-H: 3.12
His ⁸	d	8.63	4.76	3.43, 3.09		δ^2 : 7.22	ϵ^1 : 8.63	
Gly ⁹	dd	7.77	4.32, 3.81		-	-	-	-
His ¹⁰	d	8.69	5.26	3.27, 3.13	-	δ^2 : 7.26	ϵ^1 : 8.63	
Lys ¹¹	d	8.83	4.80	1.71	1.29	1.29	2.95	-
Leu ¹²	d	8.45	3.81	1.25, 0.19	0.82	0.42, -0.22	-	-
Val ¹³	d	8.58	4.08	1.59	0.86, 0.73	-	-	-
Cys ¹⁴	d	8.50	4.85	3.21, 3.10	-	-	-	-

9.6.43 Synthese von Peptid P43

[dsb^{1,14}] Ac-CHWETGK(DL-Hop)HGHKLVC-OHC₇₉H₁₀₉N₂₄O₂₂S₂ [1811.01]

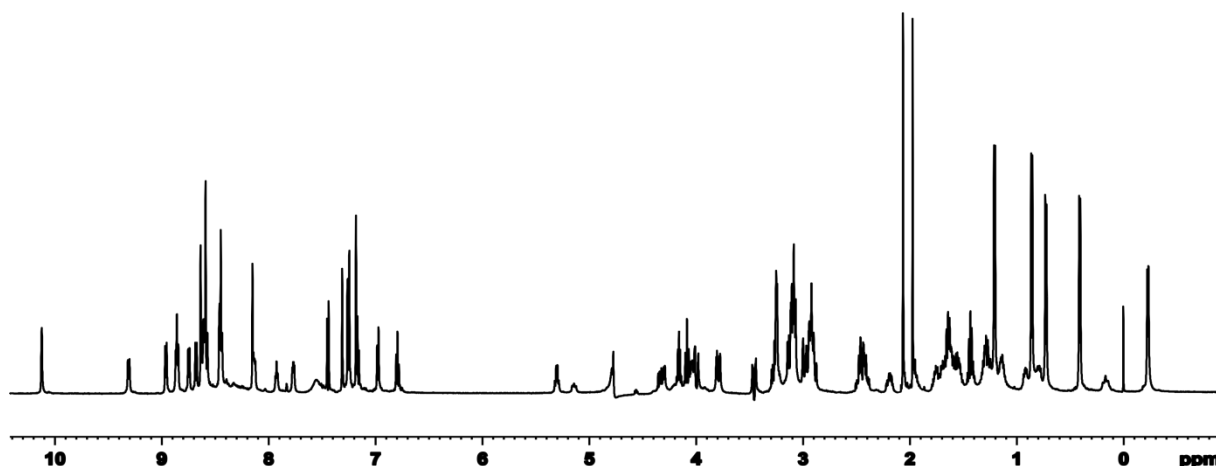
Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese im 0.1 mM Maßstab dargestellt und die Seitenkette von Lys⁷ wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift mit der racemischen Aminosäure Fmoc-DL-Hop(*t*Bu)-OH **50** modifiziert. Nach Acylierung erfolgte zusätzlich die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 20% Piperidin in DMF zweifach für je zehn Minuten. Anschließend wurde das Peptid entsprechend der allgemeinen Vorschrift zur Disulfid-Oxidation oxidiert. Nach Aufreinigung wurden 16 mg eines farblosen Feststoffs erhalten. Das Produkt wurde als ein gemischer beider diastereomerer Peptide indentifiziert.

HPLC (0.45 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 10 min):
 t_r = 6.42 min, Reinheit 99%.

Semiprep-HPLC (15 mL/min, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 t_r = 12.5 min, Reinheit 88%.

LC-MS (ESI+, MeCN, 10-40% MeCN in H₂O in 30 min):
 C₇₉H₁₀₉N₂₄O₂₂S₂⁺ (M⁺) ber.:1809.7601, gef.: 1809.7610.

¹H-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Phosphat/D₂O 9:1, pH 3.0):
 1.80 mg in 600 µL:



10. Literatur

- [1] U. Dietrich, R. Dürr, J. Koch, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2013**, *14*, 501–12.
- [2] K. Fosgerau, T. Hoffmann, *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 122–128.
- [3] H. Wennemers, *Bachem Geschäftsbericht* **2015**, 28–29.
- [4] S. J. Russell, T. Blandl, N. J. Skelton, A. G. Cochran, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 388–395.
- [5] R. M. Hughes, M. L. Waters, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 514–524.
- [6] G. Müller, G. Hessler, H. Y. Decornez, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2000**, *39*, 894–896.
- [7] J. E. Bock, J. Gavenonis, J. A. Kritzer, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 488–499.
- [8] T. M. Postma, F. Albericio, *European J. Org. Chem.* **2014**, 3720, 3503–3510.
- [9] M. Góngora-Benítez, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 901–926.
- [10] C. J. White, A. K. Yudin, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 509–524.
- [11] R. A. Turner, A. G. Oliver, R. S. Lokey, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5011–5014.
- [12] L. R. Malins, J. N. Degruyter, K. J. Robbins, P. M. Scola, M. D. Eastgate, M. R. Ghadiri, P. S. Baran, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5233–5241.
- [13] V. Castro, H. Rodríguez, F. Albericio, *ACS Comb. Sci.* **2016**, *18*, 1–14.
- [14] C. F. Zanelli, S. R. Valentini, *Amino Acids* **2007**, *33*, 351–358.
- [15] J. Schnier, H. G. Schwelberger, Z. Smit-McBride, H. Kang, J. W. Hershey, *Mol. Cell. Biol.* **1991**, *11*, 3105–3114.
- [16] A. Abbruzzese, H. M. Hanauske-Abel, M. H. Park, S. Henke, J. E. Folk, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* **1991**, *1077*, 159–166.
- [17] M. H. Park, B. L. Young, A. J. Young, *Bio. Signals* **1997**, *6*, 115–123.
- [18] Y. Tong, I. Park, B. S. Hong, L. Nedyalkova, W. Tempel, H. W. Park, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2009**, *75*, 1040–1045.

- [19] D. Bevec, H. Klier, W. Holter, E. Tschachler, P. Valent, F. Lottspeich, T. Baumruker, J. Hauber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 10829–33.
- [20] J. Hauber, *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 1806–1808.
- [21] A. Abbruzzese, M. H. Park, S. Beninati, J. E. Folk, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* **1989**, *997*, 248–255.
- [22] M. Caraglia, M. H. Park, E. C. Wolff, M. Marra, A. Abbruzzese, *Amino Acids* **2013**, *44*, 103–109.
- [23] K. Boon, H. N. Caron, R. Van Asperen, L. Valentijn, M. C. Hermus, P. Van Sluis, I. Roobeek, I. Weis, P. A. Voûte, M. Schwab, et al., *EMBO J.* **2001**, *20*, 1383–1393.
- [24] M. Caraglia, A. Budillon, G. Vitale, G. Lupoli, P. Tagliaferri, A. Abbruzzese, *Eur J Biochem* **2000**, *267*, 3919–36.
- [25] A. Abbruzzese, M. H. Park, J. E. Folk, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 3085–3089.
- [26] A. P. B. Gregio, V. P. S. Cano, J. S. Avaca, S. R. Valentini, C. F. Zanelli, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *380*, 785–790.
- [27] C. A. O. Dias, V. S. P. Cano, S. M. Rangel, L. H. Apponi, C. Frigieri, W. Garcia, M. H. Park, R. C. Garratt, C. F. Zanelli, S. R. Valentini, et al., *FEBS* **2008**, *275*, 1874–1888.
- [28] P. Saini, D. E. Eyler, R. Green, T. E. Dever, *Nature* **2009**, *459*, 118–121.
- [29] C. F. Zanelli, A. L. C. Maragno, A. P. B. Gregio, S. Komili, J. R. Pandolfi, C. A. Mestriner, W. R. Lustri, S. R. Valentini, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *348*, 1358–1366.
- [30] T. Shiba, H. Mizote, T. Kaneko, T. Nakajima, K. Yasuo, I. Sano, *BBA* **1971**, *244*, 523–531.
- [31] M. H. Park, *J. Biochem.* **2006**, *139*, 161–169.
- [32] T. L. Byers, J. R. Lakanen, J. K. Coward, A. E. Pegg, *Biochem. J.* **1994**, *303* (Pt 2, 363–8.
- [33] K. Nishimura, K. Murozumi, A. Shirahata, M. H. Park, K. Kashiwagi, K. Igarashi, *Biochem. J.* **2005**, *385*, 779–85.

- [34] M. K. Chattopadhyay, C. W. Tabor, H. Tabor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 13869–13874.
- [35] Y. A. Joe, M. H. Park, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 25916–25921.
- [36] K. Sasaki, M. R. Abid, M. Miyazaki, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 1677–1683.
- [37] E. C. Wolff, S. B. Lee, M. H. Park, *Methods Mol. Biol.* **2011**, *720*, 195–205.
- [38] J. H. van Esch, M. a M. Hoffmann, R. J. M. Nolte, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1599–1610.
- [39] F. Böttcher, R. D. Adolph, T. Hartmann, *Phytochemistry* **1993**, *32*, 679–689.
- [40] E. C. Wolff, Y. B. Lee, S. Il Chung, J. E. Folk, M. H. Park, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 8660–8666.
- [41] Y. A. Joe, E. C. Wolff, Y. B. Lee, M. H. Park, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32679–32685.
- [42] E. C. Wolff, J. E. Folk, M. H. Park, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 15865–15871.
- [43] J. H. Park, E. C. Wolff, J. E. Folk, M. H. Park, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 32683–32691.
- [44] J. Jakus, E. C. Wolff, M. H. Park, J. E. Folk, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 13151–13159.
- [45] Y. B. Lee, J. E. Folk, *Bioorganic Med. Chem.* **1998**, *6*, 253–270.
- [46] S. Specht, S. R. Sarite, I. Hauber, J. Hauber, U. F. Görbig, C. Meier, D. Bevec, A. Hoerauf, A. Kaiser, *Parasitol. Res.* **2008**, *102*, 1177–1184.
- [47] M. H. Park, E. C. Wolff, Y. B. Lee, J. E. Folk, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27827–32.
- [48] D. I. Liao, E. C. Wolff, M. H. Park, D. R. Davies, *Structure* **1998**, *6*, 23–32.
- [49] Y. A. Joe, E. C. Wolff, M. H. Park, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22386–92.
- [50] Kee Ryeon Kang, E. C. Wolff, Myung Hee Park, J. E. Folk, Soo Il Chung, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18408–18412.
- [51] Y. Tao, Kuang Yu Chen, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 23984–23987.
- [52] C. J. Bult, O. White, G. J. Olsen, L. Zhou, R. D. Fleischmann, G. G. Sutton, J. A. Blake, L. M. Fitzgerald, R. A. Clayton, J. D. Gocayne, et al., *Science (80-.)*. **1996**, *273*,

- 1058–1073.
- [53] C. E. Bell, T. O. Yeates, D. Eisenberg, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 2084–2096.
- [54] T. C. Umland, E. C. Wolff, M. H. Park, D. R. Davies, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 28697–28705.
- [55] Z. P. Chen, Y. P. Yan, Q. J. Ding, S. Knapp, J. A. Potenza, H. J. Schugar, K. Y. Chen, *Cancer Lett.* **1996**, *105*, 233–239.
- [56] S. Balabanov, A. Gontarewicz, P. Ziegler, U. Hartmann, W. Kammer, M. Copland, J. Hauber, T. L. Holyoake, A. Nordheim, T. H. Bru, *Pharmacologia* **2007**, *109*, 1701–1711.
- [57] S. K. Lee, J. Lee, S. I. Lee, W. J. Bae, Y. M. Lee, J. S. Park, S. K. Lee, S. J. Park, S. K. Min, E. C. Kim, *J. Oral Pathol. Med.* **2009**, *38*, 792–800.
- [58] Z. Han, N. Sakai, L. H. Böttger, S. Klinke, J. Hauber, A. X. Trautwein, R. Hilgenfeld, *Structure* **2015**, 882–892.
- [59] K. Nishimura, S. B. Lee, J. H. Park, M. H. Park, *Amino Acids* **2012**, *42*, 703–710.
- [60] V. S. P. Cano, F. J. Medrano, M. H. Park, S. R. Valentini, *Amino Acids* **2010**, *38*, 479–490.
- [61] V. V. Vu, J. P. Emerson, M. Martinho, Y. S. Kim, E. Münck, M. H. Park, L. Que, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 14814–14819.
- [62] Y. S. Kim, K. R. Kang, E. C. Wolff, J. K. Bell, P. Mcphie, M. H. Park, *J. Biol. Chem.* **2007**, *281*, 13217–13225.
- [63] P. Nordlund, H. Eklund, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 758–766.
- [64] K. R. Kang, Y. S. Kim, E. C. Wolff, M. H. Park, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 211–220.
- [65] B. J. Wallar, J. D. Lipscomb, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2625–2658.
- [66] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. ...* **2009**, *30*, 2785–2791.
- [67] Y. Maruo, A. Gochi, A. Kaihara, H. Shimamura, T. Yamada, N. Tanaka, K. Orita, *Int. J. Cancer* **2002**, *100*, 491–498.
- [68] L. Andrus, P. Szabo, R. W. Grady, A.-R. Hanauske, T. Huima-Byron, B. Slowinska, S.

- Zagulska, H. M. Hanauske-Abel, *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 1807–1818.
- [69] H. M. Hanauske-Abel, D. Saxena, P. E. Palumbo, A. R. Hanauske, A. D. Luchessi, T. D. Cambiaghi, M. Hoque, M. Spino, D. D. A. Gandolfi, D. S. Heller, et al., *PLoS One* **2013**, *8*, DOI 10.1371/journal.pone.0074414.
- [70] D. Saxena, M. Spino, F. Tricta, J. Connelly, B. M. Cracchiolo, A.-R. Hanauske, D. D'Alliessi Gandolfi, M. B. Mathews, J. Karn, B. Holland, et al., *PLoS One* **2016**, *11*, e0154842.
- [71] M. D. Minden, D. E. Hogge, S. J. Weir, J. Kasper, D. A. Webster, L. Patton, Y. Jitkova, R. Hurren, M. Gronda, C. A. Goard, et al., *Am. J. Hematol.* **2014**, *89*, 363–368.
- [72] W. M. Kemper, K. W. Berry, W. C. Merrick, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 5551–5557.
- [73] Z. Smit-McBride, T. E. Dever, J. W. B. Hershey, W. C. Merrick, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 1578–1583.
- [74] P. M. J. Clement, C. A. Henderson, Z. A. Jenkins, Z. Smit-McBride, E. C. Wolff, J. W. B. Hershey, M. H. Park, H. E. Johansson, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4254–4263.
- [75] Z. A. Jenkins, P. G. Hååg, H. E. Johansson, *Genomics* **2001**, *71*, 101–109.
- [76] X. Y. Guan, J. S. T. Sham, T. C. M. Tang, Y. Fang, K. K. Huo, J. M. Yang, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 3806–3809.
- [77] P. M. J. Clement, H. E. Johansson, E. C. Wolff, M. H. Park, *FEBS J.* **2006**, *273*, 1102–1114.
- [78] Y. Bin Teng, X. X. Ma, Y. X. He, Y. L. Jiang, J. Du, C. Xiang, Y. Chen, C. Z. Zhou, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2009**, *77*, 736–740.
- [79] M. Yao, A. Ohsawa, S. Kikukawa, I. Tanaka, M. Kimura, *J. Biochem.* **2003**, *133*, 75–81.
- [80] Y. Seko, T. Fujimura, T. Yao, H. Taka, R. Mineki, K. Okumura, K. Murayama, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13737.
- [81] C. M. Venkatachalam, *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425–1436.
- [82] A. J. Wilkinson, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 519–524.

- [83] R. Stanfield, T. Fieser, R. Lerner, I. Wilson, *Science* (80-.). **1990**, 248, 712–719.
- [84] E. G. Hutchinson, J. M. Thornton, *Protein Sci.* **1994**, 3, 2207–2216.
- [85] K. S. Rotondi, L. M. Gierasch, *Biopolymers* **2006**, 84, 13–22.
- [86] M. Körling, *β -turns Jenseits natürlicher Limitierungen*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, **2015**.
- [87] B. Eckhardt, *Synthetische Dipeptidbausteine Zur Stabilisierung der Struktur von Proteinen*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, **2009**.
- [88] H. Kessler, C. Griesinger, J. Lautz, *Angew. Chemie* **1984**, 96, 434–435.
- [89] B. Ciani, M. Jourdan, M. S. Searle, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9038–9047.
- [90] S. J. Russell, A. G. Cochran, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12600–12601.
- [91] J. H. Park, M. L. Waters, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 69–77.
- [92] P. N. Cheng, J. S. Nowick, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 3166–3173.
- [93] C. M. Micklitsch, P. J. Knerr, M. C. Branco, R. Nagarkar, D. J. Pochan, J. P. Schneider, *Angew. Chemie* **2011**, 123, 1615–1617.
- [94] J. R. Frost, C. C. G. Scully, A. K. Yudin, *Nat. Chem.* **2016**, 8, 1–7.
- [95] J. R. Cochrane, D. H. Yoon, C. S. P. McErlean, K. A. Jolliffe, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, 8, 1344–1351.
- [96] S. L. Mangold, D. J. O. Leary, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**.
- [97] D. B. Diaz, A. K. Yudin, *Nat. Chem.* **2017**, 9, 731–742.
- [98] A. J. Wommack, J. J. Ziarek, J. Tomaras, H. R. Chileveru, Y. Zhang, G. Wagner, E. M. Nolan, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 13494–13497.
- [99] I. Knyght, L. Clifton, Y. Saaka, M. J. Lawrence, D. J. Barlow, *Langmuir* **2016**, 32, 7403–7410.
- [100] A. S. Ravipati, A. G. Poth, S. Troeira Henriques, M. Bhandari, Y. H. Huang, J. Nino, M. L. Colgrave, D. J. Craik, *J. Nat. Prod.* **2017**, 80, 1522–1530.
- [101] S. Troeira Henriques, D. J. Craik, *Biochemistry* **2017**, 56, 669–682.

- [102] Z. Dekan, I. Vetter, N. L. Daly, D. J. Craik, R. J. Lewis, P. F. Alewood, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15866–15869.
- [103] A. S. Galanis, F. Albericio, M. Grøtli, *Biopolymers* **2009**, *92*, 23–34.
- [104] W. A. Van Der Donk, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 5223–5225.
- [105] A. G. Cochran, R. T. Tong, M. A. Starovasnik, E. J. Park, R. S. McDowell, J. E. Theaker, N. J. Skelton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 625–632.
- [106] T. Blandl, A. G. Cochran, N. J. Skelton, *Protein Sci.* **2003**, *12*, 237–47.
- [107] J. K. Myers, C. N. Pace, J. M. Scholtz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 2833–2837.
- [108] S. Fischer, A. Geyer, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 3849–3853.
- [109] S. Fischer, *β -Hairpin-Peptide zur Erkennung von Antikörpern gegen Rheumatoide Arthritis*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, **2015**.
- [110] A. Schrimpf, A. Geyer, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 2129–2132.
- [111] A. Schrimpf, U. Linne, A. Geyer, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2512–2521.
- [112] S. Gietzen, *Synthese und Charakterisierung von Polymer-Wirkstoff-Antikörper Konjugaten zur Anwendung in der Krebsimmuntherapie*, Dissertation, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, **2015**.
- [113] E. F. R. Vogt, J. W. Gratama, *Cytometry* **1996**, *1*, 22–31.
- [114] D. W. Hedley, M. L. Friedlander, I. W. Taylor, C. A. Rugg, E. A. Musgrove, *J. Histochem. Cytochem.* **1983**, *33*, 1333–1335.
- [115] H. M. Shapiro, *J. Nat. Canc. Inst.* **1989**, *81*, 632.
- [116] S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M. A. Hotz, P. Lassota, F. Traganos, *Cytometry* **1992**, *13*, 795–808.
- [117] M. Roederer, *Cytometry* **2001**, *205*, 194–205.
- [118] I. Nicoletti, M. C. Migliotari, F. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, *J. Immunol. Methods* **1991**, *139*, 271–279.

- [119] C. Riccardi, I. Nicoletti, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1458–1461.
- [120] N. Baumgarth, M. Roederer, *J. Immunol. Methods* **2000**, *243*, 77–97.
- [121] U. Schneider, H. Schwenk, G. Bornkamm, *Int. J. Canc.* **1977**, *19*, 621–626.
- [122] L. Borella, L. Sen, *J. Immun.* **1973**, *111*, 1257–1260.
- [123] G. W. Bornkamm, H. Stein, K. Lennert, F. Rüggeberg, H. Bartels, H. zur Hausen, *Int. J. Canc.* **1976**, *17*, 177–181.
- [124] R. Pearson, Y. K. Kim, J. Hokello, K. Lassen, J. Friedman, M. Tyagi, J. Karn, *J. Virol.* **2008**, *82*, 12291–303.
- [125] B. Das, C. Dobrowolski, A. M. Shahir, Z. Feng, X. Yu, J. Sha, N. F. Bissada, A. Weinberg, J. Karn, F. Ye, *Virology* **2015**, *474*, 65–81.
- [126] K. Kamimura, H. Hojo, M. Abe, *Path. Int.* **2004**, *54*, 224–230.
- [127] V. Lohr, Y. Genzel, I. Jordan, V. Sandig, U. Reichl, *Chemie Ing. Tech.* **2009**, *81*, 1262.
- [128] Y. Takeuchi, M. O. McClure, M. Pizzato, *J. Virol.* **2008**, *82*, 12585–12588.
- [129] M. Tyagi, R. J. Pearson, J. Karn, *J. Virol.* **2010**, *84*, 6425–6437.
- [130] D. A. Donahue, S. M. Bastarache, R. D. Sloan, M. A. Wainberg, *J. Virol.* **2013**, *87*, 9620–32.
- [131] M. J. Churchill, J. L. Moore, M. Rosenberg, D. W. Brighty, *J Virol* **1996**, *70*, 5786–5790.
- [132] W. Gan, R. E. Rhoads, *Biochemistry* **1996**, 623–626.
- [133] H. Kotanides, N. C. Reich, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 25555–25561.
- [134] D. Hartley, S. Corvera, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 21939–21943.
- [135] A. Rumbo, A. Mourino, L. Castedo, J. L. Mascarenas, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6114–6120.
- [136] G. Liu, S. C. Miller, F. W. Bruenger, *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 3247–3253.
- [137] T. P. A. Kruck, T. E. Burrow, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *88*, 19–24.

- [138] P. S. Dobbin, R. C. Hider, A. D. Hall, P. D. Taylor, P. Sarpong, J. B. Porter, G. Xiao, D. van der Helm, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2448–2458.
- [139] W. A. Andayi, T. J. Egan, J. Gut, P. J. Rosenthal, K. Chibale, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 642–646.
- [140] M. X. Zhang, C. F. Zhu, Y. J. Zhou, X. Le Kong, R. C. Hider, T. Zhou, *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, *84*, 659–668.
- [141] T. Zhou, L.-L. Shao, S. Battah, C.-F. Zhu, R. C. Hider, B. J. Reeder, A. Jabeen, A. J. MacRobert, G. Ren, X. Liang, *Med. Chem. Commun.* **2016**, *7*, 1190–1196.
- [142] A. Agrawal, S. L. Johnson, J. A. Jacobsen, M. T. Miller, L. H. Chen, M. Pellecchia, S. M. Cohen, *ChemMedChem* **2010**, *5*, 195–199.
- [143] T. Ozturk, E. Ertas, O. Mert, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5210–5278.
- [144] S. Chaves, M. Gil, S. Canário, R. Jelic, M. J. Romão, J. Trincão, E. Herdtweck, J. Sousa, C. Diniz, P. Fresco, et al., *Dalton Trans.* **2008**, 1773–82.
- [145] J. I. Lachowicz, V. M. Nurchi, G. Crisponi, M. G. Jaraquemada-Pelaez, M. Arca, A. Pintus, M. A. Santos, C. Quintanova, L. Gano, Z. Szewczuk, et al., *Dalt. Trans.* **2016**, *45*, 6517–6528.
- [146] R. H. Zuhse, M. W. Wong, C. Wentrup, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3917–3922.
- [147] U. Sørensen, E. Falch, P. Krogsgaard-larsen, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1003–1007.
- [148] F. J. Zawacki, M. T. Crimmins, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6499–6502.
- [149] M. Koreeda, H. Akagi, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1197–1200.
- [150] A. K. Garkushenko, N. V. Poendaev, M. A. Vorontsova, G. P. Sagitullina, *Chem. Heterocycl. Compd.* **2011**, *47*, 470–481.
- [151] B. P. F. Diaz Ropero, M. R. J. Elsegood, G. Fairley, G. J. Pritchard, G. W. Weaver, *European J. Org. Chem.* **2016**, *2016*, 5238–5242.
- [152] M. Hoque, H. M. Hanauske-Abel, P. Palumbo, D. Saxena, D. D’Alliessi Gandolfi, M. H. Park, T. Pe’ery, M. B. Mathews, *Retrovirology* **2009**, *6*, 90.
- [153] M. Pujato, C. Bracken, R. Mancusso, M. Cataldi, M. L. Tasayco, *Biophys. J.* **2005**, *89*,

- 3293–302.
- [154] J. Sarzynska, L. Nilsson, T. Kulinski, *Biophys. J.* **2003**, 85, 3445–3459.
- [155] D. S. Wishart, C. G. Bigam, A. Holm, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1995**, 5, 67–81.
- [156] S. Batjargal, Y. Huang, Y. J. Wang, E. J. Petersson, *J. Pept. Sci.* **2014**, 20, 87–91.
- [157] K. Wang, B. Zhang, W. Zhang, J. Yan, J. Li, R. Wang, *Peptides* **2008**, 29, 963–968.
- [158] M. Schutkowski, M. Jakob, G. Landgraf, I. Born, K. Neubert, G. Fischer, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 245, 381–385.
- [159] S. Mukherjee, H. Verma, J. Chatterjee, *Org. Lett.* **2015**, 17, 3150–3153.
- [160] B. H. Kessler, H. Matter, A. Geyer, H. Diehl, M. Kock, G. Kurz, F. R. Opperdoes, M. Callens, R. K. Wierenga, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **1992**, 31, 328–330.
- [161] A. Reiner, D. Wildemann, G. Fischer, T. Kiefhaber, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8079–8084.
- [162] J. H. Miwa, a K. Patel, N. Vivatrat, S. M. Popek, a M. Meyer, *Org. Lett.* **2001**, 3, 3373–3375.
- [163] C. R. Walters, D. M. Szantai-Kis, Y. Zhang, Z. E. Reinert, W. S. Horne, D. M. Chenoweth, E. J. Petersson, *Chem. Sci.* **2017**, 8, 2868–2877.
- [164] C. Unverzagt, A. Geyer, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1992**, 31, 1229–1230.
- [165] D. Brillon, *Synth. Commun.* **1990**, 20, 3085–3095.
- [166] F. A. Larik, A. Saeed, U. Muqadar, H. El-Seedi, M. Failsal, P. A. Channar, H. Mehfooz, *Phosphorous, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **2017**, 192, 1–48.
- [167] Y. Rao, X. Li, P. Nagorny, J. Hayashida, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 6684–6686.
- [168] F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, C. Peggion, *European J. Org. Chem.* **2013**, 3455–3463.
- [169] M. Ashraf Shalaby, C. W. Grote, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 9045–9048.

- [170] B. Zacharie, M. Lagraoui, M. Dimarco, C. L. Penney, L. Gagnon, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2046–2052.
- [171] A. Budzowski, A. Linden, H. Heimgartner, *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 1471–1488.
- [172] D. Wildemann, M. Drewello, G. Fischer, M. Schutkowski, *Chem. Comm.* **1999**, 1809–1810.
- [173] A. Senning, H. C. Hansen, M. F. Abdel-Megeed, W. Mazurkiewicz, B. Jensen, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 739–746.
- [174] J. Chatterjee, B. Laufer, H. Kessler, *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 432–444.
- [175] K. C. K. Swamy, N. N. B. Kumar, E. Balaraman, K. V. P. P. Kumar, *Chem. Rev.* **2009**, 2551–2651.
- [176] V. Fülöpová, M. Soral, *ACS Comb. Sci.* **2015**, *17*, 570–591.
- [177] J. Chatterjee, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1331–1342.
- [178] J. Chatterjee, D. Mierke, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15164–15172.
- [179] S. Zhang, T. Govender, T. Norström, P. I. Arvidsson, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6918–6920.
- [180] L. Aurelio, J. S. Box, R. T. C. Brownlee, A. B. Hughes, M. M. Sleebs, *J. Org. Chem.* **2003**, 2652–2667.
- [181] M. Teixido, F. Albericio, E. Giralt, *J. Pept. Res.* **2005**, *65*, 153–166.
- [182] Y. M. Angell, C. García-Echeverría, D. H. Rich, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5981–5984.
- [183] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678–9683.
- [184] J. Costa, E. Frbrot, P. Jouin, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437–2446.
- [185] E. Falb, T. Yechezkel, Y. Salitra, C. Gilon, *J. Pept. Res.* **1999**, *53*, 507–517.
- [186] L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5401–5402.
- [187] R. Roodbeen, S. L. Pedersen, M. Hosseini, K. J. Jensen, *European J. Org. Chem.* **2012**,

- 2012, 7106–7111.
- [188] J. Winkler, *Steric Substrate Mimicry : Formstabile β - Hairpin Peptide des eif5a-Proteins zur Inhibierung der Desoxyhypusin-Hydroxylase*, Bachelorarbeit, Philipps-Universität Marburg, **2016**.
- [189] Y. K. Kang, I. K. Yoo, D. Wemmer, *Biopolymers* **2016**, 105, 653–664.
- [190] L. Wu, D. Mcelheny, V. Setnicka, J. Hilario, T. A. Keiderling, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2012**, 80, 44–60.
- [191] G. Müller, M. Gurrath, M. Kurz, H. Kessler, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **1993**, 15, 235–251.
- [192] M. Tamaki, I. Sasaki, M. Kokuno, M. Shindo, M. Kimura, Y. Uchida, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 1791.
- [193] D. Gramberg, C. Weber, R. Beeli, J. Inglis, C. Bruns, J. A. Robinson, *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 1588–1606.
- [194] B. Banerji, M. Bhattacharya, R. B. Madhu, S. Kumar Das, J. Iqbal, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 6473–6477.
- [195] B. Eckhardt, W. Grosse, L.-O. Essen, A. Geyer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, 107, 18336–18341.
- [196] M. Körling, A. Geyer, *European J. Org. Chem.* **2015**, 2015, 6448–6457.
- [197] A. Wuttke, S. N. Fischer, A. Nebel, M. Marsch, A. Geyer, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 5032–5048.
- [198] S. N. Fischer, A. Geyer, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, 11, 2646–2653.
- [199] J. S. Nowick, J. O. Brower, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 876–877.
- [200] C. J. Hasson, G. E. Caldwell, R. E. A. Van Emmerik, *Accounts Chem. Res.* **2009**, 27, 590–609.
- [201] R. K. Spencer, H. Li, J. S. Nowick, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 5595–5598.
- [202] J. Zheng, C. Liu, M. R. Sawaya, B. Vadla, S. Khan, R. J. Woods, D. Eisenberg, W. J. Goux, J. S. Nowick, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 3144–3157.

- [203] J. F. Ponte, X. Sun, N. C. Yoder, N. Fishkin, R. Laleau, J. Coccia, L. Lanieri, M. Bogalhas, L. Wang, S. Wilhelm, et al., **2016**, DOI 10.1021/acs.bioconjchem.6b00117.
- [204] P. M. Kao, A. W. Mccue, H. L. Chappelle, *Bioconjug. Chem.* **1990**, *1*, 71–76.
- [205] C. R. Fenoli, C. N. Bowman, *Chem. Mat.* **2014**, *26*, 724–744.
- [206] B. H. Northrop, S. H. Frayne, U. Choudhary, *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 3415–3430.
- [207] T. M. Diogo, *Modifikation von Peptideigenschaften durch metallbindende DOPA-analoge Aminosäurebausteine*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, **2013**.
- [208] B. M. Schiavi, D. J. Richard, M. M. Joullié, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 620–624.
- [209] M. Berwe, W. Jöntgen, J. Krüger, Y. Cancho-Grande, T. Lampe, M. Michels, H. Paulsen, S. Raddatz, S. Weigand, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 1348–1357.
- [210] P. J. Coleman, K. M. Brashear, B. C. Askew, J. H. Hutchinson, C. a McVean, L. T. Duong, B. P. Feuston, C. Fernandez-Metzler, M. A. Gentile, G. D. Hartman, et al., *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4829–4837.
- [211] L. Struk, J. G. Sosnicki, *Synthesis (Stuttg.)* **2012**, *44*, 735–746.
- [212] B. Imperiali, T. J. Prins, S. L. Fisher, *J. Org. Chem.* **1993**, *11*, 1613–1616.
- [213] B. Imperiali, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6795–6798.
- [214] H. S. Lee, G. Spraggon, P. G. Schultz, F. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2481–2483.
- [215] B. Cuenoud, A. Y. Schepartz, *Tetrahedron* **1991**, *41*, 2535–2542.
- [216] C. De Cola, G. Fiorillo, A. Meli, S. Aime, E. Gianolio, I. Izzo, F. De Riccardis, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 424–31.
- [217] B. B. Abrams, H. Hänel, T. Hoehler, *Clin. Dermatol.* **1991**, *9*, 471–477.
- [218] K. N. Raymond, V. C. Pierre, *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 3–8.
- [219] P. D. Garimella, A. Datta, D. W. Romanini, K. N. Raymond, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14704–14709.
- [220] A. Datta, K. N. Raymond, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 938–947.

- [221] Z. Zhang, S. a Nair, T. J. McMurry, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 751–778.
- [222] W. Cheng, I. E. Haedicke, J. Nofiele, F. Martinez, K. Beera, T. J. Scholl, H. L. M. Cheng, X. A. Zhang, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 516–520.
- [223] S. Y. Han, Y. A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447–2467.
- [224] K. Yazawa, K. Numata, *Molecules* **2014**, *19*, 13755–13774.
- [225] M. R. Blomberg, T. Borowski, F. Himo, R.-Z. Liao, P. E. M. Siegbahn, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3601–58.
- [226] P. Vossenbergh, H. H. Beeftink, T. Nuijens, M. A. Cohen Stuart, J. Tramper, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2012**, *75*, 43–49.
- [227] P. Vossenbergh, R. Beeftink, M. C. Stuart, H. Tramper, *Biotechnol. Prog.* **2013**, *29*, 870–875.
- [228] S. J. Zuend, M. P. Coughlin, M. P. Lalonde, E. N. Jacobsen, *Nature* **2009**, *461*, 968–970.
- [229] P. Etayo, A. Vidal-Ferran, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 728–54.
- [230] C. Nájera, J. M. Sansano, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4584–4671.
- [231] D. a. Evans, T. C. Britton, J. a. Ellman, R. L. Dorow, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4011–4030.
- [232] R. Dharanipragada, E. Nicolas, G. Toth, V. J. Hruby, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6841–6844.
- [233] G. G. Rajeshwaran, M. Nandakumar, R. Sureshababu, A. K. Mohanakrishnan, *Org. Lett.* **2010**, *13*, 1270–1273.
- [234] J. A. Brown, V. K. Ahuja, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2226–2230.
- [235] C. A. Brown, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 1900–1904.
- [236] N. G. Gaylord, *J. Chem. Educ.* **1957**, *34*, 367.
- [237] C. Perez, K. B. Daniel, S. M. Cohen, *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1662–1667.
- [238] E. Taylor, F. Kienzle, *J. Org. Chem.* **1968**, *2*, 1672–1674.

- [239] A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504.
- [240] É. A. Enyedy, O. Dömötör, E. Varga, T. Kiss, R. Trondl, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *117*, 189–197.
- [241] Q. Zhou, C. Henoumont, L. Vander Elst, S. Laurent, R. N. Muller, *Contrast Media Mol. Imaging* **2011**, *6*, 165–167.
- [242] J. Reutzel, T. M. Diogo, A. Geyer, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 8450–8456.
- [243] M. Jullian, A. Hernandez, A. Maurras, K. Puget, M. Amblard, J. Martinez, G. Subra, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 260–263.
- [244] J. Reutzel, D. M. Klee, S. Singh, H. M. Hanauske-Abel, C. Dobrowolski, J. Karn, D. MacDonald, V. Guerrini, M. Gennaro, A. Geyer, *Provisional Pat.* **2017**, EFS ID: 29473051.
- [245] T. R. Graham, M. M. Kozlov, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2010**, *22*, 430–436.
- [246] I. Török, B. Farkas, *Mykosen* **1986**, *29*, 486–490.
- [247] N. Singhal, D. N. B. Path, U. Handa, M. D. Path, **2010**, 553–555.
- [248] D. Tseng, J. Volkmer, S. B. Willingham, H. Contreras-Trujillo, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 11103–11108.
- [249] M. M. Hughes, R. H. Field, V. H. Perry, C. L. Murray, C. Cunningham, *GLIA* **2017**, *2030*, 2017–2030.
- [250] M. Wang, D. Zhao, Y. Yang, J. Liu, J. Wang, X. Yin, L. Yang, X. Zhou, *PLoS One* **2014**, *9*, e102785.
- [251] M. M. P. Pearce, E. J. Spartz, W. Hong, L. Luo, R. R. Kopito, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6768.
- [252] I. Abubakar, M. Zignol, D. Falzon, M. Raviglione, L. Ditiu, S. Masham, I. Adetifa, N. Ford, H. Cox, S. D. Lawn, et al., *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13*, 529–539.
- [253] R. Thomas, L. Fine, K. Lay, I. Paula, *JAMA* **1996**, *276*, 1229–1235.
- [254] F. J. Maldonado-arocho, J. A. Fulcher, B. Lee, K. A. Bradley, **2006**, *61*, 324–337.

- [255] M. A. Tam, A. Rydstr, S. M., M. J. Wick, *Immun. Rev.* **2008**, 225, 140–162.
- [256] E. Manor, I. Sarov, *Infect. Immun.* **1986**, 54, 90–95.
- [257] S. Adamson, M. Yeo, N. Acosta, M. Llewellyn, H. Sa, N. Gonza, J. S. Patterson, M. W. Gaunt, G. A. J. Miles, E. Lo, et al., *Int. J. Parasitol.* **2005**, 35, 225–233.
- [258] J. R. Perfect, W. E. Dismukes, F. Dromer, D. L. Goldman, J. R. Graybill, R. J. Hamill, T. S. Harrison, R. A. Larsen, O. Lortholary, M. Nguyen, et al., *CID* **2010**, 50, 291–322.
- [259] R. L. Sheets, J. Stein, T. S. Manetz, C. Duffy, M. Nason, C. Andrews, W. Kong, G. J. Nabel, P. L. Gomez, *Tox. Sci.* **2006**, 91, 610–619.
- [260] WHO, [http://lumibyte.eu/medical/maps-multi-drug-resistant-tuberculosis/#prettyPhoto\[gallery3375\]/0/](http://lumibyte.eu/medical/maps-multi-drug-resistant-tuberculosis/#prettyPhoto[gallery3375]/0/) **2012**, 11.07.2017-16:36 Uhr.
- [261] P. Nahid, S. E. Dorman, N. Alipanah, P. M. Barry, J. L. Brozek, A. Cattamanchi, L. H. Chaisson, R. E. Chaisson, C. L. Daley, M. Grzemska, et al., *Clin. Inf. Dis.* **2016**, 63, 147–195.
- [262] M. Chem, F. Ceccherini, C. Falciani, M. Onori, S. Scali, S. Pollini, G. M. Rossolini, A. Pini, *Med. Chem. Commun.* **2016**, 7, 258–262.
- [263] A. Wirkspektrum, P. Ritzmann, *Pharma Krit.* **2000**, 22, 69–72.
- [264] H. Vyas, G. Krishnaswamy, *New Eng. J. Med.* **2007**, 357, 2067.
- [265] W. C. Mcgarvey, D. Singh, S. G. Trevino, *Foot Ankle Int.* **1996**, 17, 496–499.
- [266] K. Seipp, *Funktionalisierung von Peptiden des eukaryotischen Translations-Initiierungsfaktors 5a Mit klinisch-relevanten Tuberkulose-Wirkstoffen auf der Basis von reversibler Chemie in Wasser*, Bachelorarbeit, Philipps-Universität Marburg, **2017**.
- [267] B. Serine, L. Inhibitors, D. C. McKinney, F. Zhou, C. J. Eyermann, A. D. Ferguson, D. B. Prince, J. Breen, R. A. Giacobbe, S. Lahiri, et al., *ACS Infect. Dis.* **2015**, 1, 310–316.
- [268] H. Cox, H. R. Snyder, *J. Org. Chem.* **1969**, 34, 2–7.
- [269] V. V. Zhdankin, P. J. P. Iii, L. Zhang, S. Fix, P. Kiprof, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 6705–6708.
- [270] J. W. Tomsho, S. J. Benkovic, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 11200–11209.

- [271] S. Schumacher, F. Grüneberger, M. Katterle, C. Hettrich, D. G. Hall, F. W. Scheller, N. Gajovic-Eichelmann, *Polymer (Guildf)*. **2011**, 52, 2485–2491.
- [272] J. M. Szewczyk, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7037–7039.
- [273] S. Chen, S. Chen, S. Hsiao, K. Wang, *Biotech. Lett.* **1991**, 13, 773–778.
- [274] S. Knapp, J. J. Hale, M. Bastos, A. Molina, K. Y. Chen, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 6239–6256.
- [275] R. J. Bergeron, M. X. B. Xia, O. Phanstiel IV, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 6804–6806.
- [276] R. J. Bergeron, W. R. Weimar, R. Müller, C. O. Zimmerman, B. H. McCosar, H. Yao, R. E. Smith, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 3888–3900.
- [277] A. Song, J. Tom, Z. Yu, V. Pham, D. Tan, D. Zhang, G. Fang, T. Yu, K. Deshayes, *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 3677–3681.
- [278] K. Tomooka, A. Nakazaki, T. Nakai, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 408–409.
- [279] I. Aillaud, D. M. Barber, A. L. Thompson, D. J. Dixon, *Org. Lett.* **2013**, 15, 2946–2949.
- [280] K. Tomooka, A. Nakazaki, T. Nakai, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 6, 3317–3318.
- [281] C. D. Davies, M. C. Elliott, J. Hill-Cousins, M. U. A. Khan, T. Maqbool, J. L. Wood, *Synlett* **2008**, 14, 2028–2032.
- [282] R. J. Bergeron, C. Ludin, R. Müller, R. E. Smith, O. Phanstiel, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 3285–3290.
- [283] F. Iradier, R. Gómez Arrayás, J. C. Carretero, *Org. Lett.* **2001**, 3, 2957–2960.
- [284] J. C. Carretero, R. G. Arrayás, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 2993–3005.
- [285] X. Xiao, S. Antony, G. Kohlhagen, Y. Pommier, M. Cushman, *Bioorganic Med. Chem.* **2004**, 12, 5147–5160.
- [286] N. P. McLaughlin, P. Evans, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 518–521.
- [287] L. M. De León-Rodriguez, Z. Kovacs, G. R. Dieckmann, A. D. Sherry, *Chem. - A Eur. J.* **2004**, 10, 1149–1155.

- [288] J. M. Andersen, T. Hjelmgaard, L. O. Dragsted, J. Nielsen, *Synlett* **2012**, 531–534.
- [289] O. Mitsunobu, M. Yamada, T. Mukaiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, *40*, 935–939.
- [290] O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, *40*, 2380–2382.
- [291] S. Dandapani, D. P. Curran, *Chem. - A Eur. J.* **2004**, *10*, 3130–3138.
- [292] J. Cermak, A. Jonasova, J. Vondrakova, L. Cervinek, P. Belohlavkova, R. Neuwirtova, *Leuk. Res.* **2013**, *37*, 1612–1615.
- [293] J. R. Rodríguez, A. Rumbo, L. Castedo, J. L. Mascareñas, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 966–970.
- [294] F. López, L. Castedo, J. L. Mascareñas, *Chem. - A Eur. J.* **2002**, *8*, 884–899.
- [295] D. T. Puerta, M. Botta, C. J. Jocher, E. J. Werner, S. Avedano, K. N. Raymond, S. M. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2222–2223.
- [296] Y.-Y. Xie, M.-S. Liu, P.-P. Hu, X.-L. Kong, D.-H. Qiu, J.-L. Xu, R. C. Hider, T. Zhou, *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 2351–2359.
- [297] K. Burger, H. Schedel, J. Spengler, *Amino Acids* **1999**, *16*, 287–295.
- [298] R. De Marco, M. L. Di Gioia, A. Leggio, A. Liguori, M. C. Viscomi, *European J. Org. Chem.* **2009**, 3795–3800.
- [299] W. Tejchman, E. Zesławska, K. Zborowski, W. Nitek, M. Zylewski, *Arkivoc* **2015**, *2015*, 216–230.
- [300] M. A. Santos, M. Gil, L. Gano, S. Chaves, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 564–580.
- [301] A. Puglisi, J. Spencer, V. Oliveri, G. Vecchio, X. Kong, J. Clarke, J. Milton, *Dalt. Trans.* **2012**, *41*, 2877–2883.
- [302] N. Wutke, *Synthese eines Maltol-funktionalisierten Lysin-Derivats Für die Festphasenpeptidsynthese*, Bachelorarbeit, Philipps-Universität Marburg, **2015**.
- [303] B. Odaert, F. Jean, C. Boutillon, E. Buisine, O. Melnyk, A. Tartar, G. Lippens, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2773–83.
- [304] T. Pautzsch, C. Rode, E. Klemm, *J. für Prakt. Chemie* **1999**, *341*, 548–551.

- [305] M. Frechette, *Can. J. Chem.* **1993**, *71*, 377–383.
- [306] L. Wang, Z. Bie, S. Shang, Y. Lv, G. Li, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 35008–35013.
- [307] R. Custelcean, J. Bosano, P. V. Bonnesen, V. Kertesz, B. P. Hay, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 4025–4029.
- [308] J. Scott Killeen, W. R. Browne, M. Skupin, J.-H. Fuhrhop, J. G. Vos, *New J. Chem.* **2003**, *27*, 1078.
- [309] M. Eslami, H. R. Zare, M. Namazian, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 12552–12557.
- [310] S. Nicklisch, J. H. Waite, *Biofouling* **2013**, *28*, 865–877.
- [311] M. Nguyen, B. Meunier, A. Robert, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017*, 3198–3204.
- [312] M. K. Carter, *J. Mol. Struct.* **2007**, *831*, 26–36.
- [313] J. M. Chalovich, E. Eisenberg, *Biophys. Chem.* **2005**, *257*, 2432–2437.
- [314] P. Dwibedy, G. R. Dey, D. B. Naik, K. Kishore, P. N. Moorthy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 1915–1918.
- [315] M. D. Stallings, M. M. Morrison, D. T. Sawyer, *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 2655–2660.
- [316] J. Ye, P. Abiman, A. Crossley, J. H. Jones, G. G. Wildgoose, R. G. Compton, *Langmuir* **2010**, *26*, 1776–1785.
- [317] P. S. Carvalho, L. R. Almeida, J. H. Araujo Neto, A. C. Q. D. Medina, A. C. S. Menezes, J. E. F. Sousa, S. S. Oliveira, A. J. Camargo, H. B. Napolitano, *PLoS One* **2016**, *11*, 1–18.
- [318] J. Wu, J. Ruiz-Rodriguez, J. M. Comstock, J. Z. Dong, J. W. Bode, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1976–1979.
- [319] G. Malik, A. Natangelo, J. Charris, L. Pouysegu, S. Manfredini, D. Cavagnat, T. Buffeteau, D. Deffieux, S. Quideau, *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18*, 9063–9074.
- [320] R. Behrendt, P. White, J. Offer, *J. Pept. Sci.* **2016**, *22*, 4–27.

Danksagung

Prof. Dr. Armin Geyer danke ich für die große wissenschaftliche Freiheit, die herausragende Betreuung, den bedingungslosen Rückhalt, die Ermöglichung des USA-Aufenthalts und die schöne Zeit im Kleinwalsertal.

Jun.-Prof. Dr. Olalla Vázquez danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Prof. Dr. Jörg Sundermeyer danke ich für die Bereitschaft der Prüfungskommission anzugehören.

Der Jürgen-Manchot-Stiftung Düsseldorf danke ich für ein Promotionsstipendium, sowie die finanzielle Ermöglichung des USA-Aufenthalts und der Teilnahme am American Peptide Symposium 2017. Besonders bedanken möchte ich mich hierbei bei Elvira Thormann, die immer für jegliche Rückfragen ein offenes Ohr hatte.

Der Heinrich-Böll-Stiftung Berlin danke ich für ein Studienstipendium, den grandiosen Input auf jeder Veranstaltung und die vielen tollen Leute, die ich dort kennenlernen durfte.

Dr. Hartmut-Hanauske-Abel danke ich für die Organisation meines USA-Aufenthalts, die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, sowie die Durchführung der PBMC-Experimente in Zusammenarbeit mit Dr. Sukwinder Singh.

Prof. Dr. Jonathan Karn danke ich für freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe. Ich danke ihm weitergehend für die vielen fachlich sehr fundierten Gespräche und die bewundernswerte Professionalität mit der er nicht nur eine Arbeitsgruppe, sondern ein ganzen Forschungsinstitut leitet.

Dr. David MacDonald danke ich für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der Mikroskopie-Experimente und Auswertung derer. Zudem möchte ich mich für die vielen Reisetipps bezüglich Chicagos bedanken und wünsche ihm einen erfolgreichen Start in Washington.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. David Alvarez-Carbonell, der in meinen ersten Tagen für all meine Sorgen ein offenes Ohr hatte und mit kubanischem Essen und Spirituosen stets für die richtige Work-Life-Balance gesorgt hat. Ich hoffe, du isst mittlerweile etwas mehr als nur Suppe zu Mittag und lässt dir das schlechte Wetter in Cleveland nicht allzu sehr auf das Gemüt schlagen. Ich wünsche Eldis und dir nur das Beste für die Zukunft und ich

freue mich sehr auf London nächstes Jahr!

Dr. Paul Wille danke ich für die offene Mitarbeit an diesem Projekt im Labor. Danke, dass du der Ursprung meiner Hamilton-Sucht bist und dafür, dass du immer wieder für eine bessere Welt einsteht. Deine offene und herzliche Art habe ich sehr geschätzt.

Curtis Dobrowolski danke ich für seine Engelsgeduld und die herausragende Betreuung im Labor. Danke dafür, dass du auch nach der hundertsten Reservierung des Zytometers meinerseits noch immer ruhig geblieben bist und danke für die vielen schönen Freitagabende nach dem Lab-Meeting mit Eis und Bier.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Karn und MacDonald danke ich für die schöne Zeit im Labor: Dr. Biswajit Das, Dr. Lalith Gunawardane, Dr. Uri Mbonye, Dr. Jennifer Cenker-Humensky, Dr. Meenakshi Shukla, Brinn Omabegho und Joel Morales.

Meinem temporären Mitbewohner Jeremy Gutow danke ich für alles das, womit man hier problemlos mehrere Seiten füllen könnte. Danke für die fantastische Thanksgiving-Erfahrung, die Einblicke ins Judentum und unsere grandiosen Tagesausflüge, allen voran der Trip zu den Niagara Falls. Danke dafür, dass du mir gezeigt hast, dass amerikanische Küche nicht immer nur Burger und Fries bedeutet und dass die Twilight Zone eine wirklich grandiose Serie ist! *Go Browns!*

Der kompletten Familie Arellano danke ich für die Herzlichkeit mir gegenüber, die vielen Abende mit heißer Schokolade vor dem TV während mal wieder ein Schneesturm durch Cleveland zog, den schönen Tag in der Rock'n'Roll Hall of Fame und bei der Rally von Barack Obama.

Sam Ursu danke ich für die schönen Wochenenden im Agora oder bei Craftbeer im Hafen. Ich hoffe, du kommst mich bald einmal besuchen!

Dr. Shashi Chillappagari und Virajith Garapati danke ich für die Einarbeitung in die Zellkultur und die gute Zusammenarbeit im Mukoviszidose-Projekt.

Allen Beteiligten meines Auslandssemesters in Stellenbosch danke ich für die tolle Zeit in diesem wunderbaren Land. Im Einzelnen sind dies: Prof. Dr. Bert Klumperman, Dr. Rueben Pfukwa, Dr. Waled Hadasha, Dr. Alex Ilchev, Lonwabo Tyutyuza, Bonga Nokangela, Luvujo Mjodo, Bram Roenhorst und Rob Ward.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Geyer danke ich für die gemeinsamen Jahre auf A6 und im Neubau.

Dr. Matthias Körling danke ich für die grandiose Zeit auf Sri Lanka! Hiermit möchte ich mich aufrichtig für all den Umstand entschuldigen, den ich dort mit meiner Tollpatschigkeit und meinem kaputten Fuß verursacht habe. Wenn wir schon dabei sind, entschuldige ich mich außerdem für die vielen Streiche, bei denen du allzu oft die Opferrolle einnehmen musstest, obwohl ich sagen muss, dass die Rolle dir sehr gut stand! Auch wenn deine Arbeit nicht den erwünschten Ertrag lieferte, habe ich deine Expertise immer sehr geschätzt!

Dr. Maryna Abacilar danke ich für die vielen ehrlichen Worte in schwierigen Zeiten und die schöne, gemeinsame Zeit in Eisenach und Dresden (auch wenn du sie womöglich kein Stück genossen hast). Ich hoffe, dass wir auch in Zukunft voneinander hören und wir es vielleicht doch noch einmal schaffen, gemeinsam in die Ukraine zu fliegen. Du hast es mir versprochen!

Dr. André Wuttke danke ich für seine unfassbar ehrliche Art, die zu dem ein oder anderen legendären Seminar-Austraster führte. Danke deine grandiose, fachliche Kompetenz und deinen Fußball-Sachverstand, den du leider allzu selten montags morgens im Kaffeeraum geteilt hast. Danke für all den Aufwand, den du für die neue HPLC betrieben hast, so dass wir nicht länger auf einem museumreifen, grauen Kasten messen mussten. Auch du hast die Zeit hier oben überstanden und das sogar ohne dass du ein Kapitel in deiner Diss über „Rumpimmelei an der HPLC“ schreiben musstest. Bleibt nur noch die Frage zu klären, warum die neue HPLC so lange auf Backsteinen stand?

Dr. Matthias Lamping danke ich für die vielen fachlichen Diskussionen und die Betreuung des Synthies. Außerdem danke ich dir für deine entspannte Art, mit der du das alles hier oben gesehen hast

Andreas Schrimpf danke ich für die vielen Gespräche mit und vor allem ohne Tiefsinn! Danke für deine gekonnte Portion Selbstironie und Pragmatismus, mit der du Tag für Tag das Unheil über dich ergehen lässt. Danke für die vielen schönen Abende im Quod, im Havanna oder wo auch immer, auch wenn der ein oder andere am nächsten Morgen mit dem Kater seines Lebens aufgewacht ist.

Stefan Lenz danke ich für eine wunderbare Zeit in Marokko und danke, dass du mir deine Begeisterung für muslimische Länder weitergeben konntest. Ich schätze deine Offenheit und Toleranz gegenüber fremden Kulturen sehr und falls du mal wieder einen Reisepartner brauchst, rufe mich einfach an!

Bei Maximilian Jung bedanke ich mich für eine schöne Zeit in Krakau. Danke für deine vielen Hilfen bei Coreldraw, Pymol und wie die scheußlichen Programme alle heißen. Außerdem möchte ich mich für deine unendliche Kreativität bedanken, mit der du immer wieder Ausreden dafür gefunden hast, dass du es mal wieder nicht pünktlich zur Arbeit geschafft hast. Weiterhin möchte ich dich hiermit daran erinnern, dass du noch immer nicht deinen 30. Geburtstag mit uns gefeiert hast (Stand 14.12.2017).

Fabian Daus danke ich dafür für die Bereitwilligkeit das Dresden-Projekt zu übernehmen. Ich wünsche dir viel Erfolg mit Amininen und Phosphaten, weiterhin grandiose OGP-Studenten und viele weitere Fahrten nach Dresden, bei denen du dann über Form und Funktion deiner Moleküle berichten kannst.

Philip Horx, zunächst Vertiefer und mittlerweile Arbeitskollege, danke ich für die vielen unterhaltsamen Momente, in denen du das ein oder andere Mitglied des Fachbereichs perfekt imitiert hast. Danke für deine Hilfe bei so einigen technischen Fragestellungen und deinen herausragenden Musikgeschmack. Wichtig ist, dass bei dir immer ein Molekül gerechnet wird! Wir sehen uns nächstes Jahr in London, Happy Twitching!

Christoph Priem danke ich für die kulinarische Vielfalt, die du uns immer wieder mit deinem ausgewogenen Mittagessen vorgelebt hast. Danke für die Bereitstellung des Benzoboroxols und die vielen fachlichen Diskussionen darüber.

Michelle Krüger danke ich für die schöne Zeit in Chicago, bei The Pretty Reckless, den Broilers und die ein oder andere zu lange Nacht im Hirsch, nach der öfters Mal das Seminar für uns ausfallen musste. Danke für die vielen Kaffee- und Gelatopausen, mit denen wir vor den täglichen Kaffeeraum-Weisheiten geflüchtet sind. Danke, dass du kein Blatt vor den Mund nimmst, vor allem wenn im Kaffeeraum mal wieder der AfD-Stammtisch Lebensweisen von sich gab. Der nächste Kaffee mit Eierlikör geht auf mich!

Dennis Klee, zunächst zweifacher Kochsklave und mittlerweile auch schon Arbeitskollege, danke ich für die fleißige Mitarbeit an diesem Projekt. Danke für eine super Zeit in Kanada, die uns mit Ziplining, Grizzly-Bären, Hot Tub und Poutine in guter Erinnerung bleiben wird.

Danke für deinen bewunderswerten und unterhaltsamen Weizenbierkonsum, auch wenn die Stadtwerke Marburg die Hinterlassenschaften an der Bushaltestelle Frankfurter Straße sicher nicht so toll fanden. Danke für die wöchentlichen Ausflüge ins Quod und zur Dönerbude unseres Vertrauens. Deine tiefgründigen Lebensweisenheiten im Laboralltag, wie beispielsweise: „*Das Gute am Lawessons Reagenz ist, da kann ich im Labor furzen wie ich will*“ werden mir auf jeden Fall fehlen.

Steffen Müller danke ich für die fleißige Mitarbeit im Labor. Danke, dass du immer für jeden noch so dummen Spaß zu haben warst. Eigentlich wollte ich mich gerade noch bei Jens bedanken, aber der ist gerade nicht da. Das ist noch irgendwie ne?

Lennart „Der Bub“ Nicke danke ich für eine grandiose Zeit in Regensburg. Danke für die vielen guten Gespräche mit und ohne Tiefsinn, die vielen Freitage mit grandios schlechter Musik im Labor und die vielen abendlichen Speisungen, ob im Steakhaus oder doch Winner Winner Chicken Dinner. Ich wünsche dir weiterhin viel Erfolg in deinem klassischen, organischen Labor und dass du noch so einige Aromaten einfrieren wirst!

Christian Heinrich Müller, dem Orakel des Fachbereichs, danke ich für die tägliche Bereicherung mit aktueller Fachliteratur. Danke für die schönen gemeinsamen Stunden im Pool, in der Spelunke, in der Schnitzelstube oder bei Ulf. Danke, dass du mittlerweile mit deiner Anwesenheit unser Seminar bereicherst und dich gelegentlich sogar einmal mit Chemie beschäftigst. Es wird mal wieder Zeit für einen Craftbeer-Abend, auch wenn es sicher noch viel zu warm für Käsefondue ist! *One step into the cellar, we take another one!*

Fabian Fischer danke ich für die vielen Abende, bei denen du mich mit herausragendem Essen versorgt hast. Danke für die vielen Panchetta-Lieferungen und die vielen Abende im Quod oder im Hirsch, wenn du mal mehr als 2,20 Euro dabei hattest. Ein Foto von Sigggi funktioniert einfach immer, um dich in den Hirsch zu locken!

Dr. Sandra Gebhardt danke ich für einige Molekülverbrummungen an der chiralen HPLC und die vielen Abende, bei denen du die Spelunke mal nicht um halb Acht verlassen hast.

Christopher Pfaff danke ich für die Versorgung der Spelunke mit den nötigen Kaltgetränken. Danke außerdem für die vielen Lektionen in Schwedisch, die Bestimmung der Oxidationszahl des Schwefels im Sulfation bei der Bundeswehr und deinen herausragenden Filmgeschmack. *Nu maste vi skola!*

Michel Fischer danke ich für das zur Verfügung stellen von hunderten Chemikalien. Außerdem danke ich dir für die Hilfe beim Umzug und einen legendären Abend bei System of a down!

Dr. Michael Schween und Dr. Carsten Auel danke ich ihr Engagement bei der Organisation der Praktikas. Wenn jeder hier oben so viel Eifer in die Lehre stecken würde, würde es sicher besser um unser Fachgebiet stehen!

All meinen Bachelorstudenten und Vertiefern danke ich für ihre fleißige Mitarbeit an diesem Projekt. Im Einzelnen sind dies: Peter Susnik, Tobias Vollgraff, Christopher Sherwood, Andreas Schmidt, Philip Horx, Nicole Wutke, Julius Winkler, Stefan Vieth, Lukas Heyder, Dennis Klee, Matthäus Drabek, Baptiste Vatin und Kevin Seipp.

Meinem ehemaligen Vertiefer und Fastnachbar Lukas „Jean-Luc“ Heyder danke ich für die vielen schönen Abende bei gutem Essen, bei Ulf oder auch im Hirsch, auch wenn das nicht immer ein glimpliches Ende nahm.

Meinem Kommilitonen Niels Lichtenberger danke ich für die vielen gemeinsamen Abende auf den Konzerten von Avantasia, Edguy, Disturbed, Avenged Sevenfold, Stone Sour und viele mehr. Das noch einige Konzerte folgen mögen!

Dominik Keiper danke ich für die vielen unvergesslichen Abende in der Oberstadt, die leider viel zu oft mit einem frühmorgendlichen Imbiss bei Bereket oder Lecker Eck endeten. Danke für deine ungekümmerte, hessische Mundart und vielen grandiosen gemeinsamen Erlebnisse im Praktikum, auch wenn Johannes Wygasch nicht teilnehmen durfte.

All den Jungs und Mädels vom Easyfitness Marburg danke ich dafür, dass ihr immer bedingungslos meine Launen (ob gut oder schlecht) ertragen musstet. Im Einzelnen sind dies: Tom, Simon, Achim, Lea, Ricarda, Annika, Axel, Adriano und Nils. Ganz besonders möchte ich mich bei Maximilian Schunder bedanken. Danke für deine Trainingspläne und dafür, dass du mich einige Male wieder auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt hast!

Meiner Familie danke ich für die finanzielle, materielle und moralische Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Promotion. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen!

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass eine Promotion noch an keiner anderen Hochschule als am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg versucht wurde.

Ich versichere, dass ich meine vorgelegte Dissertation mit dem Titel:

„Das eif5a-Epitop jenseits biologischer Restriktionen – Synthese & funktionelle Analytik“

Selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet, sowie die Dissertation in der vorliegenden oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Marburg, 18.12.2017

Jan Reutzel